



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública



Maria Alice Varjal de Melo Santos

Aedes aegypti (DIPTERA:CULICIDAE): ESTUDOS
POPULACIONAIS E ESTRATÉGIAS INTEGRADAS
PARA CONTROLE VETORIAL EM MUNICÍPIOS
DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, NO
PERÍODO DE 2001 A 2007

RECIFE
2008

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M827a Santos, Maria Alice Varjal de Melo.

Aedes aegypti: estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007./ Maria Alice Varjal de Melo Santos. — Recife: M. A. V. M. Santos, 2008.

218 p.: il. tab.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

Orientadora: Lêda Narcisa Regis.

1. Aedes. 2. Dengue - prevenção & controle. 3. Bacillus. 4. Controle de vetores. 5. Monitoramento. 6. Oviposição. 7. Estudos Populacionais em Saúde Pública. I. Regis, Lêda Narcisa. II. Título.

CDU 616.98

MARIA ALICE VARJAL DE MELO SANTOS

***Aedes aegypti* (DIPTERA:CULICIDAE): ESTUDOS POPULACIONAIS E
ESTRATÉGIAS INTEGRADAS PARA CONTROLE VETORIAL EM MUNICÍPIOS
DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, NO PERÍODO DE 2001 A 2007**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: **Dra. Lêda Narcisa Regis**

RECIFE

2008

MARIA ALICE VARJAL DE MELO SANTOS

***Aedes aegypti* (DIPTERA:CULICIDAE): ESTUDOS POPULACIONAIS E
ESTRATÉGIAS INTEGRADAS PARA CONTROLE VETORIAL EM MUNICÍPIOS
DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, NO PERÍODO DE 2001 A 2007**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 27/06/2008

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lêda N. Regis
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Maria Helena Neves Lôbo Silva Filha
Departamento de Entomologia/ CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Departamento de Entomologia/ CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque
Departamento de Zoologia/UFPE

Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Dedico este trabalho aqueles que mais amo em minha vida:

À Maria Lúcia Regueira, minha mãe e Paulo Varjal, meu pai (*In memoriam*),

Às minhas filhas Maria Cicília e Bruna Maria,

Ao meu esposo e companheiro de todas as horas Sérgio Oliveira,

Às minhas irmãs, Marília, Rosario, Ângela e Analúcia,

Aos meus irmãos Paulo, Francisco, Antônio, José Carlos e José Henrique (*In memoriam*),

À minha sogra, “Nina”, às minhas cunhadas (Márcia e Mônica) e cunhado (Sílvio).

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças para trilhar mais uma jornada em minha vida e que me deu como aliadas as pessoas que menciono abaixo e tantas outras que permanecerão em minha lembrança.

À Dra. Lêda Narcisa Regis, pela orientação, amizade, estímulo e ensinamentos imprescindíveis à realização deste trabalho e a minha formação como pesquisadora e pessoa.

Ao Dr. André Freire Furtado pela grande contribuição dada a este trabalho em outros momentos, pelos ensinamentos e exemplos constantes de paixão e ética pela ciência.

Ao Doutorado em Saúde Pública, na pessoa do Coordenador Dr. Wayner Souza, Vice-Coordenadora Dra. Eduarda Cesse, Secretaria Acadêmica com referência especial à Nilda, bem como aos professores, pelos ensinamentos importantes para minha formação acadêmica.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, na pessoal dos Diretores, Chefes e Vice-chefes no período de 2004 a 2008, pelo apoio institucional e infra-estrutura que possibilitaram a concretização deste trabalho.

À Dra. Eugênia Maranhão Rios, pelo estímulo, confiança e fornecimento do biolarvicida utilizado neste estudo.

Ao Centro de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde do Recife, nas pessoas de Adriana, Marconi, Carlos Ramos e equipe técnica dos Agentes de Saúde Ambiental (ASAs) pelo apoio técnico na operacionalização das ações em campo.

Ao Centro de Vigilância Ambiental/Secretaria de Saúde de Moreno, em especial ao Cláudio Júlio e ao Edvaldo Apolinário, bem como a equipe de campo, atores imprescindíveis a operacionalização das estratégias de controle;

*Ao Centro de Vigilância Ambiental/Secretaria de Saúde do Jaboatão dos Guararapes pela disponibilização de dados entomológicos sobre a infestação por *Aedes aegypti*.*

À Dra Cláudia Fontes, pela cuidadosa revisão do manuscrito deste trabalho.

Aos membros da Banca, titulares e suplentes (Dr. Simão dias Vasconcelos Filho/Depto. de Zoologia-UFPE e Dr. Wayner Viera de Souza/Depto. de Saúde Coletiva-NESC-CPqAM), pelas contribuições científicas dadas a este trabalho.

Em especial às amigas Cláudia Fontes, Constância Ayres, Maria Helena Silva Filha, Cleide Ribeiro, Janaína Melo, Ridelane Veiga e Tereza Magalhães pelo carinho, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

Às novas amizades conquistadas com o Projeto SAUDAVEL, especialmente Miguel Monteiro (Miguelito) e Constantino Silveira Júnior, pela grande colaboração na análise espacial dos dados desta tese, pela troca de conhecimentos, trabalho em equipe, e sobretudo, pela coragem de abraçar novos desafios.

Aos amigos Daniela Bandeira, Gleice Santos, Ana Paula Araújo, Éllyda Gomes, Ridelane Veiga, Ieda Ferreira, Marcelo Paiva, Duschinka Guedes, Tatiane Souza e Julião Varjal pela colaboração direta ou indireta na obtenção e sistematização das informações trabalhadas nesta tese.

Aos companheiros e servidores da Fundação Nacional de Saúde, Ribeiro, Roberto, Edmar, Sílvio, João e Pedro, pela dedicação e imprescindível colaboração nos trabalhos a campo.

Aos amigos do Departamento de Entomologia/CPqAM em especial a Ana Lúcia, Alaíde, Jorge, Márcio, Mônica, Rosineide, Duschinka, Marcelinho, Mariana, Ieda e Tatiane pela colaboração e incentivo constantes.

Ao amigo George Tadeu e demais profissionais do Laboratório de Estatística e Métodos Quantitativos, especialmente ao Carlos Luna, Leila Rameh e Flávio Santos, pela colaboração no tratamento estatístico dos dados deste trabalho.

À Mégine, por todas as orientações na normatização bibliográfica deste trabalho, e aos demais integrantes da biblioteca do CPqAM pelo empenho na aquisição de material bibliográfico.

Aos amigos do Aggeu Magalhães Edneide, Gisele, Janaína Miranda, Iêda, Ana, Rafael Dhalia, Ana Brito, Eduarda e tantos outros, pelo companheirismo.

Aos colegas do CEP, pelos incentivos constantes e compreensão pela longa ausência nas reuniões mensais.

Aos colegas do doutorado, Marli, Janaína, Cheila Bedor, Vera, Isabel, Sheila, Jorge, Geysler, Creso, Joselma, Fernando, Dione, Paula e Cláudia, pelo companheirismo e momentos de agradável convívio nos últimos quatro anos.

MELO-SANTOS, M. A. V. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da Região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

RESUMO

Reduzir a infestação por *Aedes aegypti* nas áreas de transmissão da dengue no Brasil continua sendo um desafio. O objetivo deste estudo foi avaliar novas abordagens para o monitoramento e controle desta espécie em municípios pernambucanos, no período de 2001 a 2007. Armadilhas de oviposição (OVT) contendo o biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e infusão de gramíneas foram utilizadas para verificar a infestação por *Aedes* em 18 bairros do Recife e seis bairros de Jaboatão, bem como para monitorar casa-casa 127 imóveis no bairro do Engenho do Meio (EM), em ciclos de 21 dias, por 12 meses. A coleta de ovos demonstrou a presença de *Aedes* spp em todos os bairros com níveis de infestação variando de 28,6% a 94,4% e densidade de 30,5 a 224,4 ovos/OVT em Recife e de 15,6% a 87,5% e 24,2 a 233,5 ovos/OVT em Jaboatão. *A. aegypti* predominou na maioria dos bairros, e *A. albopictus* foi mais abundante naqueles com maior cobertura vegetal. O estudo longitudinal revelou que o uso contínuo das OVT permitiu detectar flutuações populacionais e locais de concentração do mosquito. Um produto à base de Bti desenvolvido localmente para o controle de *A. aegypti* foi testado. A avaliação em laboratório e campo simulado revelou que o produto foi eficaz, com atividade residual de seis meses, estabilidade de armazenamento de dois anos e reciclagem em criadouros de *Aedes*. Estratégias baseadas na integração das OVT às ações de controle larvar foram implementadas de forma contínua em Nossa Senhora de Fátima (NSF)/Moreno-PE ou descontínua no Engenho do Meio (EM) e Casa Forte/Parnamirim (CFP)/Recife. O uso prolongado (4 anos) de 2 ovitampas-controle (OVT-C)/imóvel resultou na eliminação de milhares de ovos do mosquito e na redução sustentada da densidade de *Aedes* em NSF/Moreno. Em CFP e EM, 5.602 OVT-C instaladas na 1ª intervenção, potencialmente recolheram mais de 13 milhões de ovos, em cinco meses, na 2ª intervenção, cerca de 2.500 OVT-C instaladas em EM, coletaram mais de 18 milhões, em 12 meses. Os resultados mostram que: a coleta/destruição massiva de ovos integrada ao tratamento larvicida dos criadouros causou impacto negativo sobre a população de *Aedes* spp; o uso descontínuo das OVT-C levou a uma redução temporária de sua densidade. O controle de *A. aegypti* através de ovitampas é uma estratégia promissora que depende da abrangência e do tempo de uso das armadilhas em campo e conseqüentemente do número de ovos destruídos.

Palavras-chaves: *Aedes*, Dengue - Prevenção & Controle, *Bacillus*, Controle de Vetores, Monitoramento, Oviposição, Estudos Populacionais em Saúde Pública

MELO-SANTOS, M. A. V. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): populational studies and integrated strategies for vector control in the Recife Metropolitan municipalities, from 2001 to 2007. 2008. Thesis (Doctorate in Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

ABSTRACT

To reduce the infestation levels of *Aedes aegypti* urban areas still poses a public health challenge. The aim of this work was to evaluate novel approaches to monitor and control this mosquito in Recife Metropolitan municipalities, from 2001 to 2007. Ovitrap (OVT) with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) biolarvicide and hay infusion were utilized to monitor the infestation of *Aedes* spp in 18 neighborhoods of Recife and 6 in Jaboatão. Egg collection indicated the presence of *Aedes* spp in all neighborhoods, with infestation levels varying from 28.6% to 94.4% and from 15.6% to 87.5% in Recife and Jaboatão, respectively. Egg densities varied from 30.5 to 224.4 eggs/OVT in Recife, and 24.2 to 233.5 eggs/OVT in Jaboatão. *A. aegypti* was predominant in the majority of the study areas, and *A. albopictus* was more abundant in areas with larger vegetation coverage. The longitudinal study revealed that OVTs were efficient for a continuous surveillance, enabling the detection of fluctuations in mosquito population densities and areas with higher mosquito concentration. The evaluation of a Brazilian product based on Bti, developed for *A. aegypti* control, revealed that this product was effective against *Aedes* larvae, and presented a 6-month residual activity, good storage stability (2 years) and recycling capability. A strategy based on the integration of OVT to activities of larval control was implemented continuously or non-continuously in three neighborhoods. In Moreno, the continuous use of 02 control-ovitrap (C-OVT)/house resulted in a sustained reduction of *Aedes* density along 4 years, with the elimination of thousands of mosquito eggs. In Casa Forte/Parnamirim and EM, more than 13 million eggs were eliminated during the first intervention (5-month period) with the use of 5,602 C-OVT. The second intervention was restricted to EM, where 2,500 C-OVT potentially eliminated 18 million eggs. The following conclusions can be drawn: the C-OVT were well accepted by the local community (>90%); the massive collection and elimination of *Aedes* eggs, integrated to larvicidal treatment of breeding sites, caused a negative impact on mosquito population density; and strategies based on a non-continuous use of C-OVT caused a significant however temporary reduction on *Aedes* spp population density. *A. aegypti* control through the use of ovitrap is a promising strategy that depends on the number of eliminated eggs and consequently on a broaden and continuous use of this tool in the field.

Key-words: *Aedes*, Dengue, Prevention & Control, Bacillus, Vector Control, Monitoring, Oviposition, Populational Study in Public Health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.	
Figura 1	Fases que compõem o ciclo evolutivo de <i>Aedes aegypti</i> . Nota: (1) mosquito adulto; (2) ovos; (3) larva; (4) pupas. Fonte: (1) Munstermann (1995), (2) Melo-Santos (2000), (3) Russell; (2000), (4) Vieira, (2008).	33
Figura 2	Municípios pernambucanos infestados por <i>Aedes aegypti</i> e com transmissão autóctone do vírus dengue, 1995 a 2006. Fonte: Cordeiro (2008).	38
Figura 3	Aplicação perifocal de inseticidas químicos. Nota: (a) máquina pesada para aspersão espacial em ultra baixo volume (UBV), (b) máquina costal. Fonte: Avillis (2008).	43
Figura 4	Instrumentos/métodos para a coleta de formas jovens (larvas/pupas) e adultas de <i>Aedes aegypti</i> . Nota: (A) pesquisa larvária, (B) aspirador costal para a captura de mosquitos adultos, (C) armadilha Omni-Directional Fay-Prince para a coleta de mosquitos adultos, (D) armadilha Mosquitrap para coleta de fêmeas grávidas de <i>Aedes</i> . Fonte: Hock, J. W, (2008); Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.	47
Figura 5	Representação esquemática do modo de ação das toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> em larva de mosquito. Fonte: Modificado de Regis <i>et al.</i> (2001).	50
Figura 6	A) armadilha de oviposição (ovitrampa) com 1 palheta (modelo Santos <i>et al.</i> 2003); B) ovitrampa-sentinela com 3 palhetas (modelo Regis <i>et al.</i> 2008) C) ovitrampa-controle com tecido (modelo adaptado Lenhart <i>et al.</i> 2005), D) larvicida granulado à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ; E) ovitrampa instalada em área peridomiciliar; F) detecção e contagem de ovos do mosquito em microscópio estereoscópico. No destaque, ovos de <i>Aedes</i> spp depositados em tecido de algodão. Fonte: Melo-Santos (2000b), Regis (2008).	57
Figura 7	Caracteres de identificação em larvas de <i>Aedes</i> spp. Nota: (a) larva de 4º estágio com destaque para 8º segmento abdominal, (b) escamas do pecten de <i>Aedes albopictus</i> . Fonte: Nakazawa (2006).	58
Mapa 1	Mapa do Estado de Pernambuco. Em destaque vermelho os municípios de Recife e Jaboatão dos Guararapes. Fonte: Mapa de Pernambuco, (2008).	62
Figura 8	Precipitação mensal acumulada na Região Metropolitana do Recife, de 2001 a 2003. Dados coletados na Estação Meteorológica do Curado, Recife-PE. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia, (2008).	69
Figura 9	Distribuição das ovitrampas positivas em relação ao número de ovos de	

	<i>Aedes</i> spp. coletados durante 5 a 7 dias do mês de outubro de 2002 e 2003, em bairros do município de Jaboatão dos Guararapes-PE.	69
Figura 10	Análise da correlação entre os índices de infestação para <i>Aedes</i> spp.: Positividade de Ovitrapas (IPO) x Densidade de Ovos (IDO) e IPO x número médio de ovos/ovitrampa, feita para os bairros dos municípios de Jaboatão dos Guararapes (A, B, C, D) e Recife (E, F).	70
Figura 11	Frequência de ovitrapas positivas para ovos de <i>Aedes</i> spp. no bairro de Engenho do Meio, no período outubro de 2001 a setembro de 2002.	76
Figura 12	Comparação entre os níveis de infestação por <i>Aedes</i> spp. de cinco quarteirões localizados no bairro do Engenho do Meio, Recife-PE, no período de outubro de 2001 a setembro de 2002.	76
Figura 13	Flutuação temporal da densidade de ovos de <i>Aedes</i> spp. registrada por ovitrapas instaladas em 127 imóveis, distribuídos em cinco quarteirões (64-69) do bairro do Engenho do Meio, Recife-PE, registrada ao longo de 15 ciclos de coleta (C1-C15) com duração de 21 dias, no período de outubro de 2001 a setembro de 2002.	77
Figura 14	Distribuição espacial da infestação por <i>Aedes</i> spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrapas ao longo de três ciclos de coleta (1°-3°) com duração de 21 dias, no período de outubro a dezembro de 2001.	78
Figura 15	Distribuição espacial da infestação por <i>Aedes</i> spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrapas ao longo de três ciclos de coleta (4°-6°) com duração de 21 dias, no período de dezembro/01 a março/2002.	79
Figura 16	Distribuição espacial da infestação por <i>Aedes</i> spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrapas ao longo de três ciclos de coleta (7°-9°) com duração de 21 dias, no período de março a maio de 2002.	80
Figura 17	Distribuição espacial da infestação por <i>Aedes</i> spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrapas ao longo de três ciclos de coleta (10°-12°) com duração de 21 dias, no período de maio a julho de 2002.	81
Figura 18	Distribuição espacial da infestação por <i>Aedes</i> spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrapas ao longo de três ciclos de coleta (13°-15°) com duração de 21 dias, no período de julho a setembro de 2002.	82
Figura 19	Casos de dengue em habitantes do Engenho do Meio, notificados no período de janeiro a setembro de 2002 e densidade de ovos de <i>Aedes</i> spp. no mesmo período. Fonte: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco/Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2007.	84
Figura 20	Recipientes plásticos usados para avaliar produtos experimentais à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , em testes sob condições simuladas de campo. Nota: (A) recipientes colocados à sombra, (B) recipientes	

	expostos ao sol e o sistema de renovação da água, usando mangueiras e torneiras. Fonte: Araújo <i>et al.</i> (2007).	96
Figura 21	Embalagens do Antilarv®, produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti), apresentado sob a forma de comprimidos, em embalagens individualizadas. Fonte: Araújo <i>et al.</i> (2007).	97
Quadro 1	Descrição dos Testes sob Condições Simuladas de Campo (TCS) realizados com o produto experimental, Antilarv®, à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , com larvas de <i>Aedes aegypti</i> , linhagem Recife-Lab.	98
Figura 22	Valores de CL ₅₀ dos pós técnicos de um produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , em diferentes lotes de produção, mensurado por bioensaio com larvas de <i>Aedes aegypti</i> . A) Incluindo todos os lotes. B) Excluindo o lote 03, que foi considerado um valor extremo acima do limite superior do teste “outlier”. Fonte: Araújo <i>et al.</i> (2007).	100
Figura 23	Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 01 à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> mensurada para larvas de 1º estágio de <i>Aedes aegypti</i> , em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal, registrado de fevereiro a maio de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE. Fonte: Araújo <i>et al.</i> (2007).	102
Figura 24	Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> mensurada contra larvas de 1º estágio de <i>Aedes aegypti</i> , em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade associados com o nível de insolação semanal, registrado de setembro a outubro de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE. Fonte: Araújo <i>et al.</i> (2007).	103
Figura 25	Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> mensurada contra larvas de 1º estágio de <i>Aedes aegypti</i> , em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade associados com o nível de insolação semanal. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE. Fonte: Araújo <i>et al.</i> (2007).	103
Figura 26	Insolação média e temperatura máxima registradas nos meses de janeiro de 2005 a março de 2006, na Região Metropolitana do Recife. Dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE. Fonte: Araújo <i>et al.</i> (2007).	104
Figura 27	Relação entre diferentes doses da radiação gama e a viabilidade dos esporos (A) e toxicidade (B) do pó técnico de um produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , avaliada pelas unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e pelas concentrações letais (CL ₅₀) em bioensaios contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> -Recife-Lab.	108

- Figura 28** Concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* em recipientes tratados com pó técnico do produto experimental, contendo esporos ativos ou irradiados (20 KGy de radiação gama), deste patógeno, em ensaios de atividade contra larvas de *Aedes aegypti*. Os recipientes foram mantidos ao abrigo do sol, com reposição de 20% do volume de água três vezes por semana. 109
- Figura 29** Concentração de esporos viáveis em recipientes tratados com o comprimido de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, mantidos ao abrigo do sol, sem renovação de água, colonizados com larvas de *Aedes aegypti* em intervalos semanais ou mensais. 109
- Figura 30** Visualização dos bairros do município de Moreno-PE. Os círculos em vermelho indicam os bairros selecionados para implementação de novas estratégias de controle, e em preto o bairro do Centro adotado como testemunho. Fonte: MORENO, Secretaria de Saúde do Moreno-PE. 120
- Figura 31** Tipos de reservatórios de água mais freqüentes no município de Moreno-PE, comumente encontrados positivos para larvas e pupas de *Aedes* spp. Nota: (A) tanque em amianto; (B) tonel em ferro; (C) tonel em plástico; (D) caixa d'água. Fonte: Melo-Santos, (2002). 123
- Figura 32** Densidade de ovos de *Aedes* spp. observada em bairros do município de Moreno-PE nos momentos de implementação de ovitrampas para o controle complementar do mosquito associada ao uso do Bti em criadouros, representados pelos ciclos de: pré intervenção (dez/2002), intervenção 1º (dez/02-jan/03), 2º (jan-fev/03), 3º (mar-abr/03) e pós intervenção (mai-jun/03). As barras representam o número médio de ovos/ovitrampa/dia e as linhas o percentual de ovitrampas positivas. 127
- Figura 33** Índice de infestação por *Aedes* spp obtido através da coleta de ovos do mosquito, em dezembro de 2002 a 2004, no bairro de Nossa Senhora de Fátima, Moreno-PE, durante o uso contínuo de ovitrampas-controle, a partir de janeiro/2003, integrado às demais ações de controle vetorial. 128
- Figura 34** Variação longitudinal/sazonal do número médio de ovos de *Aedes* spp observada no bairro de Nossa Senhora de Fátima, Moreno-PE, durante o uso ininterrupto de ovitrampas-controle, a partir de janeiro/2003, integrado às demais ações de controle vetorial. Os dados de monitoramento referem-se a 40 ciclos de coleta realizados de abril de 2004 a maio de 2007. As linhas horizontais indicam o período de chuvas mais intensas, de abril a agosto de cada ano. 128
- Figura 35** Variação do número médio de ovos de *Aedes* spp observada para o bairro de Nossa Senhora de Fátima, Moreno-PE, durante o uso ininterrupto de ovitrampas-controle, a partir de janeiro/2003, integrado às demais ações de controle vetorial. Os dados de monitoramento referem-se a 40 ciclos de coleta realizados de abril de 2004 a maio de 2007. A linha de regressão linear mostra tendência a diminuição significativa ($p=0,008$) da densidade populacional ao longo de tempo. 129

- Figura 36** Distribuição espacial dos bairros do Recife. Em destaque as áreas de Casa Forte/Parnamirim (CFP), Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa (BT), onde foi realizado o experimento, no período de dezembro de 2004 a dezembro de 2006. Fonte: Regis *et al.* (2008). 131
- Figura 37** Imagem de satélite dos bairros de Engenho do Meio (EM), Brasília Teimosa (BT) e Casa Forte/Parnamirim (CFP), Recife-PE, registrada em 2007. Fonte: Acioli, (2007). 132
- Figura 38** Visualização dos pontos onde foram instaladas 100 armadilhas de oviposição para o monitoramento populacional de *Aedes* spp. no bairro Engenho do Meio, Recife/PE. Fonte: Acioli, (2007). 136
- Figura 39** Variação longitudinal/sazonal do número médio de ovos de *Aedes* spp observada para os bairros de Brasília Teimosa (BT), Engenho do Meio (EM) e Casa Forte/Parnamirim (CFP), Recife-PE, ao longo de 40 ciclos de monitoramento por ovitrampas sentinelas, no período de abril de 2004 a maio de 2007. 143
- Figura 40** Número de ovos de *Aedes* spp/ovitrampa sentinela/ 28 dias, coletado em diferentes áreas do Recife, de abril de 2004 a abril de 2005. A linha horizontal indica a média geral de ovos para o bairro e a linha vertical que corta Casa Forte/Parnamirim (CFP), Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa (BT) indica o momento em que foi iniciada a primeira intervenção de controle pela coleta massiva de ovos de *Aedes* spp nas duas primeiras áreas. O bairro de Brasília Teimosa foi usado como área controle. Fonte: REGIS *et al.* (2008). 144
- Figura 41** Distribuição espacial da infestação por *Aedes* spp observada a partir da densidade Kernel de ovos, nos bairros de Casa Forte/Parnamirim (CFP), Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa (BT-área testemunha), Recife-PE. Os seguintes momentos foram avaliados: abril/2004 (anterior a intervenção com ovitrampas-controle/OVT-C) e abril/2005 (ao final da intervenção com OVT-C). Os pontos de maior infestação estão evidenciados pelas cores que variam do amarelo ao vermelho. 145
- Figura 42** Análise longitudinal da tendência de crescimento populacional de *Aedes* spp a partir do número médio de ovos coletados nas Ovitrampas-sentinelas (OVT-S), instaladas no bairro de Brasília Teimosa (BT) e Engenho do Meio (EM), Recife-PE, no período de abril de 2004 a maio de 2007. 146
- Figura 43** Mapas de densidade Kernel evidenciando a infestação por *Aedes* spp, a partir da densidade de ovos, nos bairros de Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa-área sentinela (BT),/Recife-PE. A análise espacial foi feita nos seguintes momentos: abril/2004, antes da intervenção com ovitrampas-controle (OVT-C); abril/2005, primeira intervenção com OVT-C em todo o bairro de EM; abril/2006, segunda intervenção com OVT-C, na metade sul de EM e abril/2007, momento após as intervenções com OVT-C. Os pontos de maior concentração do mosquito estão destacados em tons de amarelo a vermelho. 147

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Produtos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> disponíveis no mercado internacional.	54
Tabela 2	Exemplos de metodologias aplicadas à avaliação de produtos larvicidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> para controle de <i>Aedes aegypti</i> , sob condições simuladas de campo.	55
Tabela 3	Níveis de infestação por <i>Aedes</i> spp. em bairros do município de Recife-PE, com base na pesquisa larvária e na coleta de ovos através de armadilhas de oviposição, instaladas em domicílios durante um ciclo de 5 a 7 dias, em outubro de 2001 (estação seca) e abril de 2002 (estação chuvosa).	67
Tabela 4	Níveis de infestação por <i>Aedes</i> spp. em bairros do município de Jaboatão dos Guararapes-PE, com base na pesquisa larvária e na coleta de ovos através de armadilhas de oviposição, instaladas em domicílios durante um ciclo de 5 a 7 dias, em outubro de 2002 e 2003.	68
Tabela 5	Índices de infestação por <i>Aedes</i> spp. estimados a partir da coleta por ovitrampas em 127 imóveis, localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, Recife-PE, ao longo de 15 ciclos de coleta (C1-C5) com duração de 21 dias, no período de outubro de 2001 a setembro de 2002.	83
Tabela 6	Atividade tóxica de amostras de diferentes lotes do pó técnico-Antilarv®, produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , estimada através de bioensaios contra larvas de 4º estágio de <i>Aedes aegypti</i> -Recife-Lab. Em média 480 larvas foram utilizadas em cada teste.	99
Tabela 7	Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis de diferentes lotes do pó técnico-Antilarv®, produto experimental à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , estimadas através de três bioensaios contra larvas de 4º estágio de <i>Aedes aegypti</i> -RecL e plaqueamento. Em média 1.440 larvas foram utilizadas nos três testes realizados para cada produto-lote.	101
Tabela 8	Persistência de diferentes formulações, pó técnico (PT) e comprimido (C), de um produto experimental à base <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> -Recife-Lab em recipientes colocados à sombra, de fevereiro/2005 a março/2006.	106

Tabela 9	Atividade tóxica de comprimidos à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , provenientes de dois lotes de produção, mantidos em temperatura ambiente variando de 25° a 27° C e umidade relativa de 60% a 80%, para larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Os testes foram realizados a intervalos de três meses por um período de 24 meses.	107
Tabela 10	Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> observada para o pó técnico submetido à radiação gama, mensuradas através de bioensaios de laboratório e determinação do número de esporos viáveis (UFC/ml), respectivamente.	108
Tabela 11	Níveis de infestação por <i>Aedes</i> spp. no município de Moreno-PE, estimado pela coleta de ovos através de armadilhas de oviposição, em um ciclo de cinco dias de coleta, no período de 03 a 08 de abril de 2002.	118
Tabela 12	Características da ocupação geográfica e da infestação por <i>Aedes aegypti</i> de bairros do município de Moreno, em 2002.	120
Tabela 13	Produtos à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti) utilizados no tratamento de criadouros de <i>Aedes</i> spp. no município de Moreno-PE, de dezembro/2002 a abril/2003.	121
Tabela 14	Quantidade de reservatórios de água tratados com diferentes produtos à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti) em três bairros do município de Moreno, ao longo de três ciclos de aplicação dos biolarvicidas, no período de dezembro/2002 a abril/2003.	124
Tabela 15	Parâmetros entomológicos inferidos para bairros do município de Moreno-PE, através da pesquisa por ovitrampa e larvária durante as intervenções para controle do <i>Aedes aegypti</i> , no período de dezembro de 2002 a junho de 2003.	126
Tabela 16	Parâmetros utilizados para avaliação de uma amostra das ovitampas-controle no processo de coleta de ovos de <i>Aedes</i> spp. nos bairros de Engenho do Meio (EM), Casa Forte e Parnamirim (CFP), Recife-PE, no período de dezembro de 2004 a abril de 2005.	138
Tabela 17	Estimativa do número de ovos de <i>Aedes</i> spp. potencialmente removidos do bairro do Engenho do Meio durante a coleta massiva de ovos, com ovitampas-controle, no período de dez/2004 a maio/2005.	138
Tabela 18	Estimativa do número de ovos de <i>Aedes</i> spp. potencialmente removidos dos bairros de Casa Forte/Parnamirim durante a coleta massiva de ovos, com ovitampas-controle, no período de dez/2004 a maio/2005.	139
Tabela 19	Número médio de ovos coletados em ovitampas-sentinelas (OVT-S) instaladas nos bairros de Engenho do Meio (EM) e Casa	

	Forte/Parnamirim (CFP) durante a utilização de ovitrampas-controle (OVT-C) para a coleta massiva de ovos de <i>Aedes</i> spp, no primeiro período de intervenção (IC-I), de dez/2004 a abril/2005. O bairro de Brasília Teimosa (BT) não recebeu OVT-C e foi utilizado como testemunha.	139
Tabela 20	Parâmetros utilizados para avaliação da aceitação da instalação das ovitrampas-controle para coleta de ovos de <i>Aedes</i> spp. pelos habitantes do bairro de Engenho do Meio (EM), Recife-PE, no período de dezembro de 2005 a dezembro de 2006.	140
Tabela 21	Estimativa do número de ovos de <i>Aedes</i> spp.potencialmente removidos da parte sul do bairro do Engenho do Meio após a utilização de ovitrampas-controle (OVT-C) para a coleta massiva de ovos, no período de dez/2005 a maio/2006.	141
Tabela 22	Número médio de ovos coletado em ovitrampas-sentinelas (OVT-S) instaladas nos bairros de Engenho do Meio (EM) durante a utilização de ovitrampas-controle (OVT-C) para a coleta massiva de ovos de <i>Aedes</i> spp., na parte sul do bairro, no segundo período de intervenção (IC-II), de dezembro/2005 a novembro/2006. A parte norte do bairro (EM-norte) e Brasília Teimosa (BT) não receberam OVT-C e foram utilizadas como testemunhas.	141
Tabela 23	Índices de Infestação Predial por <i>Aedes aegypti</i> (Aae) e <i>Aedes albopictus</i> (Aab) observados em bairros do Recife-PE nos anos de 2004, 2005 e 2006.	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASA	Agente de Saúde Ambiental
BIOTICOM	Bioteconológica Indústria e Comércio Ltda.
Bs	<i>Bacillus sphaericus</i>
BT	Brasília Teimosa (bairro de Recife-PE)
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar. <i>israelensis</i>
C	Comprimido
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEN	Centro (bairro de Moreno-PE)
CFP	Casa Forte/Parnamirim (bairros de Recife-PE)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
EM	Engenho do Meio (bairro de Recife-PE)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GPS	“Global Positioning System” (sistema global de posicionamento geográfico)
I.A.	Ingrediente ativo
IC-I	Intervenção de Controle-I
IC-II	Intervenção de Controle-II
IB	Índice de Breteau
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDO	Índice de Densidade de Ovos
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IP	Índice Predial
IPO	Índice de Positividade de ovitrampas
L1, L2, L3, L4	Larvas do 1º ao 4º estágio de desenvolvimento
KGy	Kilogray
MAS	Massaranduba (bairro de Moreno-PE)
NSF	Nossa Senhora de Fátima (bairro de Moreno-PE)
NSG	Nossa Senhora das Graças (bairro de Moreno-PE)
OL	Ovitrampa Letal

OVT-S/OVT-C	Ovitrapa sentinela/Ovitrapa controle
PP	Pó primário
PT	Pó técnico
PTI	Pó técnico irradiado
PSA	Programa de Saúde Ambiental
Qt	Quarteirão
SAUDAVEL	Sistema de Apoio Unificado para a Detecção e Acompanhamento em Vigilância Epidemiológica.
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
TCS	Teste sob Condições Simuladas de Campo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade Tóxica Internacional

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUCAO	22
1.1 Justificativa.	27
1.2 Pergunta Condutora	28
1.3 Apresentação da Tese	29
1ª PARTE	30
2 REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL	31
2.1 Aspectos da biologia e ecologia de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> Linnaeus, 1762	31
2.2 <i>Aedes aegypti</i>: importância epidemiológica como vetor de dengue	35
2.3 Programas de controle de <i>Aedes aegypti</i>: a experiência do Brasil	39
2.3.1 Vigilância entomológica de <i>Aedes aegypti</i>	43
2.3.1.1 <i>Armadilhas de oviposição</i>	46
2.3.2 Uso de Bti para controle de <i>A. aegypti</i> : a experiência do Brasil	48
2.4 Produção e formulação de bactérias entomopatogênicas	50
2.4.1 Metodologias para avaliação de biolarvicidas	53
3 APRESENTAÇÃO DA TESE	56
3.1 Metodologia padrão: instrumento de coleta de amostras populacionais de <i>Aedes</i>	56
3.1.1 Contagem de ovos	56
3.1.1.1 <i>Índices entomológicos</i>	57
3.1.2 Identificação das espécies de <i>Aedes</i>	58
2ª PARTE	59
4 MÉTODOS PARA O MONITORAMENTO POPULACIONAL DE <i>Aedes</i>	60
4.1 Objetivo geral	60
4.1.1 Objetivos específicos	60
4.2 Estudo I: Distribuição espacial de <i>Aedes</i> spp. em bairros do Recife e Jaboatão	

dos Guararapes-PE	61
4.2.1 Procedimentos Metodológicos	61
4.2.1.1 <i>Área de estudo</i>	61
4.2.1.2 <i>Viabilidade dos ovos de Aedes spp coletados nas armadilhas</i>	62
4.2.1.3 <i>Análise estatística</i>	63
4.2.2. Resultados	63
4.2.2.1 <i>Nível de infestação por Aedes spp nas áreas estudadas</i>	63
4.2.2.2 <i>Abundância e frequência relativa de espécies de Aedes</i>	65
4.2.2.3 <i>Viabilidade dos ovos coletados em campo</i>	66
4.3 Estudo II: Distribuição espaço-temporal de Aedes spp no bairro do Engenho do Meio, Recife-PE	71
4.3.1 Procedimentos Metodológicos	71
4.3.1.1 <i>Área de estudo</i>	71
4.3.1.2 <i>Inquérito entomológico preliminar</i>	71
4.3.1.3 <i>Monitoramento da infestação da área</i>	72
4.3.1.4 <i>Posicionamento geográfico das ovitrampas</i>	72
4.3.1.5 <i>Respostas de oviposição</i>	72
4.3.1.6 <i>Dados epidemiológicos</i>	73
4.3.1.7 <i>Análises estatísticas</i>	73
4.3.2 Resultados	73
4.4 Discussão.	84
3ª PARTE	90
5 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE POPULACIONAL DE <i>Aedes aegypti</i>	91
5.1 Objetivo geral	91
5.1.1 Objetivos específicos	91
5.2 Estudo III: Avaliação de produtos à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti) em testes sob condições simuladas de campo	92
5.2.1 Procedimentos Metodológicos	92
5.2.1.1 <i>Produto experimental analisado</i>	92

5.2.1.2 Mosquitos-alvo	92
5.2.1.3 Bioensaios de laboratório	93
5.2.1.4 Inativação dos esporos por radiação gama	93
5.2.1.5 Testes sob condições simuladas de campo (TCS)	94
5.2.1.6 Avaliação dos efeitos de variáveis bióticas e abióticas sobre a atividade larvicida residual	95
<u>5.2.1.6.1 Variáveis bióticas e abióticas</u>	95
<u>5.2.1.6.2 Densidade larval</u>	95
<u>5.2.1.6.3 Reciclagem bacteriana</u>	95
5.2.1.7 Determinação do tempo de armazenamento do produto	96
5.2.2 Resultados	99
5.2.2.1 Avaliação da toxicidade e da concentração de esporos viáveis	99
5.2.2.2 Desempenho do produto sob condições simuladas de campo	100
5.2.2.3 Efeitos dos raios gama sobre a viabilidade de esporos e toxicidade do <i>Bti</i>	104
5.2.2.4 Efeitos da frequência de colonização	105
5.2.3 Discussão	110
5.3 Estudo IV: Estratégia de controle integrado implementada em Moreno-PE	117
5.3.1 Procedimentos Metodológicos	117
5.3.1.1 Caracterização da área	117
5.3.1.2 Levantamento entomológico preliminar com base na coleta de ovos de <i>Aedes</i> spp.	117
5.3.1.3 Estratégias de controle implementadas em Moreno	119
<u>5.3.1.3.1 Biolarvicidas utilizados</u>	119
<u>5.3.1.3.2 Caracterização do padrão de oviposição na área domiciliar</u>	119
<u>5.3.1.3.3 Ovitampas-monitoramento (OVT-MON)</u>	121
<u>5.3.1.3.4 Ovitampas-controle (OVT-C)</u>	121
<u>5.3.1.3.5 Ações de monitoramento e controle por armadilhas de oviposição</u>	122
5.3.2 Resultados	123
5.4 Estudo V: Estratégias de controle integrado implementadas em Recife-PE	130
5.4.1 Procedimentos Metodológicos	130
5.4.1.1 Caracterização da área	130

<i>5.4.1.2 Estratégia de controle implementada em Recife</i>	131
<u>5.4.1.2.1 Ovitampa-controle (OVT-C)</u>	131
<u>5.4.1.2.2 Esquemas de distribuição das OVT-C</u>	133
<i>5.4.1.3 Avaliação das estratégias de controle de Aedes spp., através do monitoramento por ovitrampas-sentinelas (OVT-S)</i>	134
<i>5.4.1.4 Análise estatística</i>	135
5.4.2 Resultados	136
5.5 Discussão	149
6 CONCLUSÕES.	154
REFERÊNCIAS	156
APÊNDICES	183
Apêndice A –Manuscrito para submissão	183
Apêndice B – 1º Artigo publicado	199
Apêndice C – 2º Artigo publicado	208
ANEXOS	218
Anexo A – Parecer do CEP/CPqAM	218

1 INTRODUÇÃO

No contexto atual, a dengue é a mais importante arbovirose e representa um problema de saúde pública de ordem mundial. Estima-se que 100 milhões de casos ocorram a cada ano e que aproximadamente 2/3 da população mundial viva em áreas infestadas por mosquitos vetores (PINHEIRO; CORBER, 1997). O padrão de distribuição geográfica da dengue tem se sobreposto ao de *Aedes aegypti*, vetor primário em mais de 100 países onde a doença ocorre de forma endemo-epidêmica, sobretudo nas zonas tropicais e subtropicais do globo (GUBLER; KUNO, 1997). A inexistência de uma vacina efetiva contra os quatro sorotipos do vírus Dengue, a intensa movimentação das populações humanas e a adaptação do vetor às condições ocupacionais dos grandes centros urbanos, são apontados como fatores determinantes para a velocidade de propagação da doença (GUBLER; CLARK, 1995). É consenso que a alternativa mais viável para prevenir a doença é o controle do seu principal vetor, *A. aegypti* (GUBLER; CLARK, 1995) e eventualmente de outras espécies que possam estar implicadas, secundariamente, na transmissão como *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis*, *Aedes pseudoscutellaris* e *Aedes horrescens* (RAJU, 2003).

A reemergência da dengue no Brasil se deu na década de 1980 (SCHATZMAYR *et al.*, 1986) e epidemias explosivas têm ocorrido desde então, associadas à circulação de três sorotipos do vírus Dengue, em 26 dos 27 estados (NOGUEIRA *et al.*, 1989, 1990, 2001; SCHATZMAYR, 2000). A dengue apresenta um padrão sazonal de ocorrência, com maior incidência de casos de janeiro a junho (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999; 2002; 2003; 2005). No Estado de Pernambuco, os primeiros casos foram notificados e confirmados em 1987, em 32 dos 174 municípios, entre eles Recife e Jaboatão dos Guararapes, atualmente a transmissão autóctone da doença ocorre em todos os municípios (CORDEIRO, 2008). Análises filogenéticas identificaram que os genótipos do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 presentes em municípios pernambucanos de 1996 a 2006, foram América/África, Sudeste Asiático e Índia Subcontinental, respectivamente (CORDEIRO, 2008).

A. aegypti é a única espécie reconhecidamente implicada na transmissão do vírus dengue no Brasil, embora *A. albopictus* seja um comprovado vetor deste e de outros arbovírus no sudeste da Ásia (RUSSEL *et al.*, 1969) e esteja no país desde 1986 (FORATTINI, 1986), com ocorrência registrada em pelo menos 22 estados (ALMEIDA *et al.*, 2006; MARTINS *et*

al., 2006; SANTOS, 2003; SANTOS, NASCIMENTO, 1998). A coexistência destas espécies em áreas de transmissão ativa de dengue tem sido frequentemente referida no Brasil (GOMES, 1998; HONÓRIO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2001; REGIS *et al.*, 2008)

A expansão da dengue no Brasil, sua ocorrência endêmica e as epidemias vivenciadas nos períodos de 1986-87 e 1990-91 foram determinantes para institucionalizar, em 1996, o Programa para a Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), um programa de cunho vertical, idealizado e centralizado ao nível federal, que tinha por objetivo eliminar esta espécie do território nacional, em um período de cinco anos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). As ações de “combate” ao vetor estavam direcionadas à eliminação de criadouros e à aplicação de inseticidas químicos para eliminação de larvas. Estas ações alcançaram pouco êxito em termos de contenção da dispersão geográfica do vetor e de redução da transmissão da doença (BRAGA; VALLE, 2007a; DONALÍSIO; GLASSER, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2005). As metas do PEAa não foram atingidas no tempo previsto e o Programa foi reestruturado passando a se chamar Programa de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), com ações voltadas à redução dos níveis de infestação vetorial em todos os municípios sobretudo nas áreas consideradas mais críticas, representadas por 657 municípios (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Apesar da mudança de objetivo, a prática de controle vetorial no Programa permaneceu centrada, quase que exclusivamente, na aplicação de inseticidas químicos organofosforados. Estima-se que em 2002 mais de 800 milhões de reais tenham sido gastos para vigilância e controle vetorial, sobretudo para aquisição de inseticidas e máquinas pesadas para sua aplicação em ultra baixo volume (UBV) (BRAGA; VALLE, 2007a). Naquele mesmo ano, o país vivenciou a mais severa epidemia de dengue, com notificação de 776 mil casos clássicos da doença (CORDEIRO, 2008). Uma nova versão do Programa, intitulada Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) passou a vigorar no final de 2002 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

O uso continuado do larvicida temefós desde 1967 foi selecionando ao longo do tempo populações de *A. aegypti* resistentes a este composto (MONTELLA *et al.*, 2007). A partir de 2000 a resistência passou a ser detectada e produtos biológicos à base da bactéria entomopatógena *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) passaram a ser utilizados como medida de manejo da resistência ao temefós, apenas nos locais onde foi confirmada a

resistência (ANASTÁCIO, 2002; BRAGA; VALLE, 2007b; BRAGA, *et al.* 2004; LIMA *et al.*, 2003; MACORIS *et al.*, 1999; 2003). Além de ser um larvicida eficiente contra *A. aegypti*, Bti apresenta mecanismo de ação seletivo e diferenciado dos inseticidas químicos (BECKER, 2000; BOISVERT; BOISVERT, 2000; REGIS *et al.*, 2000, 2001 THIÉRY; FOUQUE, 1998; THIÉRY *et al.*, 1999) aspecto que certamente norteou sua escolha para o programa (BRAGA; VALLE, 2007b).

Atualmente, mais de 10 produtos à base de Bti estão disponíveis no mercado internacional, a maioria deles sob formulação líquida ou em granulos de sabugo de milho, consideradas menos apropriada ao tipo de criadouro de *A. aegypti* (BECKER 2000; COUCH 2000; MELO-SANTOS, 2001a). Segundo Capalbo *et al.* (2008), alguns fatores têm limitado a utilização de produtos biológicos à base de bactérias entomopatogênicas em programas de controle de insetos vetores no Brasil, entre eles o custo com a importação, transporte e distribuição. De acordo com estes autores, a produção local/regional poderia reduzir os custos do produto, além de gerar desenvolvimento tecnológico pela implantação de indústrias de fermentação. De alguma forma, a demanda crescente deste biolarvicida tem levado ao engajamento de instituições brasileiras como a FIOCRUZ, IPA, EMBRAPA, UFPE, UEL entre outras, e em menor proporção a iniciativa privada, no desenvolvimento de produtos à base de Bti em escala experimental, semi-industrial e industrial (ARAÚJO *et al.*, 2007; CAPALBO *et al.*, 2008; MELO-SANTOS *et al.*, 2001a; 2001b). Desde 2005, a empresa Bthek Biotecnologia Ltda produz em larga escala (1.000 L/ano) o Bt-horus SC, uma suspensão concentrada formulada com uma cepa autóctone de Bti, com registro nacional (CAPALBO *et al.*, 2008).

O tratamento dos criadouros com produtos larvicidas, apesar de representar uma forma importante de controle, nem sempre é suficiente para manter populações de mosquitos em baixas densidades por longos períodos, sobretudo *A. aegypti*, que é capaz de distribuir grupos de ovos em qualquer tipo de recipiente que possa acumular água (REGIS *et al.*, 2008). Este comportamento favorece a existência de criadouros crípticos do mosquito, que não são alcançados pelas ações de controle (AYRES *et al.*, 2004). Outros aspectos da biologia desta espécie, como elevada taxa de fecundidade e fertilidade, curto ciclo de vida, capacidade adaptativa às mudanças ambientais e resistência dos ovos à ausência de água, contribuem para seu rápido crescimento populacional (SCHOFIELD, 1991). Sabe-se que mudanças na densidade da espécie-alvo são importantes epidemiologicamente, visto que a frequência de

contato vetor-hospedeiro é um dos fatores determinantes da capacidade vetorial de uma população de mosquitos (BLACK; MOORE 1996).

Assim, a implementação de medidas que atenuem o aparecimento de situações críticas requer um sistema de vigilância entomológica eficiente, com métodos suficientemente sensíveis para detectar tais mudanças, em tempo real (REGIS *et al.*, 2008).

A vigilância entomológica desempenha papel decisivo na avaliação do impacto das medidas de controle sobre a população do inseto vetor e no seu redirecionamento (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; GOMES, 2002). Os índices mais utilizados para o monitoramento de *A. aegypti* em programas de controle no mundo são o Índice de Infestação Predial (IIP) e o Índice de Breteau (IB). Ambos estão baseados na presença/ausência de recipientes contendo larvas/pupas do mosquito (criadouro) na unidade territorial de amostra (imóvel) e não consideram a densidade/produtividade destes criadouros (GOMES, 1998; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). São operacionalmente laboriosos e dependem em grande medida da habilidade do operador em localizar os possíveis criadouros positivos para larvas/pupas no imóvel. Um aspecto muitas vezes negligenciado com relação à presença de larvas em um criadouro é que não há como afirmar que elas sejam representativas da população de fêmeas, reprodutivamente ativas, presente no ambiente naquele momento e lugar, em função da característica de quiescência dos ovos e da dispersão passiva destes, frequentemente promovida pela ação antrópica. Além disso, não são indicadores da densidade de adultos e, portanto, apresentam grandes limitações para avaliar riscos epidemiológicos (BRAGA; VALLE, 2007a; GOMES, 1998; GUBLER; KUNO, 1997).

A armadilha de oviposição (ovitrampa), idealizada por Fay e Perry (1965), apesar de ser considerada a ferramenta mais sensível para detecção de *A. aegypti*, contraditoriamente, não é a mais empregada para seu monitoramento nos programas de controle, a exemplo do PNCD (BRAGA *et al.* 2000; BRAGA; VALLE, 2007a). Os índices calculados a partir de ovos permitem estimar a distribuição e, de certa forma, a densidade populacional deste mosquito nas áreas infestadas (GOMES, 1998). Entretanto, alguns aspectos são referidos como desvantagens no uso de ovitrampas entre eles o processo laborioso de contagem dos ovos em microscópio estereoscópico, a impossibilidade de identificar, com facilidade, as espécies a partir desse estágio de desenvolvimento e de estimar o número de fêmeas a partir do quantitativo de ovos (BRAGA *et al.*, 2000). As vantagens mais evidenciadas estão

relacionadas ao menor tempo requerido para sua manipulação em campo, maior sensibilidade para detecção da presença de *Aedes* spp. e baixo custo em termos de manutenção comparada a pesquisa larvaria (ACIOLI, 2007; BRAGA *et al.*, 2000; CHIARAVALLI, 1997; GAMA *et al.*, 2007; GOMES, 1998; REGIS *et al.*, 2008; RITCHIE *et al.*, 2008).

A captura de mosquitos adultos em locais de repouso, por aspiração mecânica é um método eficiente para o monitoramento de *Aedes*, que resulta na coleta de um grande número de indivíduos. Além disto, provê informações imediatas sobre as espécies presentes no ambiente, e possibilita a obtenção de outras relacionadas a seu estado fisiológico, comportamento e infecção vetorial (BARATA *et al.*, 2001; CLARK; SEDA; FERNÁNDEZ; FORATTINI, 2003; GUBLER, 1994). Alguns estudos referem os custos relacionados à manutenção destes equipamentos como aspectos que podem limitar sua utilização na rotina de programas de controle (GUBLER; KUNO, 1997; KROCKEL *et al.*, 2006; TIDWELL *et al.*, 1990). Entretanto, vantagens e desvantagens estão presentes em todos os métodos e devem ser consideradas na comparação custo/benefício. Outros estudos a campo têm mostrado que alguns modelos de armadilhas para coleta de adultos podem ser eficientes para a detecção de espécies de *Aedes*, com vantagens relativas aos processos de contagem e identificação dos adultos, comparado à coleta de ovos (FACCHINELLI *et al.*, 2007; JONES, *et al.*, 2003; KROCKEL *et al.*, 2006; MACIEL-DE-FREITAS; EIRAS; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2006; RITCHIE, 2004; RUSSELL; RITCHIE, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2006a; WILLIAMS *et al.*, 2006b).

A implementação de medidas capazes de prevenir o crescimento populacional explosivo de *A. aegypti* requer um sistema de vigilância entomológica eficiente, com métodos sensíveis e robustos o suficiente para detectar variações de densidade populacional da espécie alvo.

1.1 Justificativa

As estratégias adotadas pelo Programa Nacional de Controle de Dengue (PNCD) não têm sido, até o momento, capazes de responder à complexidade epidemiológica da doença, de seus determinantes sócio-ambientais e do controle de seu vetor, *A. aegypti*. Apesar da realização das ações de controle e da incorporação de elementos voltados à informação sobre a doença e as formas de eliminação dos criadouros do mosquito, pouco se avançou em termos de mobilização social e participação comunitária de forma a gerar um impacto importante e sustentável destas medidas sobre o crescimento populacional de *A. aegypti* no Brasil. Diante de circunstâncias adversas, sejam elas técnicas ou ambientais, a vigilância de vetores deve estar preparada para responder aos desafios que se apresentam, buscando aliar eficiência, baixo custo e facilidade operacional aos métodos de monitoramento.

No contexto atual, é necessária e urgente a adoção de novas abordagens para a vigilância e controle de *A. aegypti* que estejam voltadas ao manejo ambiental e à integração de métodos biológicos e comportamentais. É importante testar possibilidades que substituam ou minimizem o uso de inseticidas químicos, e que sejam sustentáveis para os serviços públicos municipais. Ações de controle dirigidas à eliminação de ovos podem levar a uma redução da dispersão passiva e da permanência oculta do mosquito no ambiente.

Estudos que avaliem o desempenho de larvicidas biológicos desenvolvidos no Brasil e de armadilhas de oviposição como ferramentas para a vigilância e o controle de *A. aegypti*, nas condições atuais, são necessários para verificar sua eficiência para a redução da infestação vetorial em áreas urbanas do País e para discutir a viabilidade da sua incorporação ao PNCD.

1.2 Pergunta condutora

Novas estratégias, com base no uso de armadilhas e de larvicidas biológicos, para obtenção de amostras populacionais e eliminação massiva de ovos, integradas à redução de criadouros, são capazes de ampliar a competência em vigilância e controle de *Aedes aegypti*?

1.3 Apresentação da Tese

Esta tese está composta por três partes, a primeira delas apresenta uma revisão sucinta da literatura sobre a biologia, ecologia, importância epidemiológica e os métodos empregados para o monitoramento e controle do mosquito *Aedes aegypti*, bem como os procedimentos comuns aos estudos envolvendo a utilização de armadilhas de oviposição (ovitrapas), descritos nas partes subsequentes.

Na segunda parte, são apresentados dois estudos independentes relacionados à distribuição espacial de populações de *A. aegypti* e *A. albopictus* nos municípios de Recife e Jaboatão dos Guararapes, situados na Região Metropolitana do Recife/PE. As informações para elaboração destes trabalhos foram obtidas a partir do Banco de Dados do Monitoramento de *Aedes aegypti* por Ovitrapas e do Sistema de Informação do Programa de Controle de Febre Amarela e Dengue (SISFAD), dos respectivos municípios.

A terceira parte apresenta mais três estudos, também independentes, dirigidos à avaliação de novas apresentações de um produto à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e estratégias de integração das ovitrapas às outras ações para o controle de *A. aegypti*, nos municípios de Recife e Moreno-PE. Informações sobre os índices de infestação por *Aedes* spp., aspectos ambientais, climatológicos e epidemiológicos foram obtidas a partir das seguintes fontes: Banco de Dados do Monitoramento de *Aedes aegypti* por Ovitrapas do município de Moreno, SISFAD, Banco de Dados do Projeto SAUDAVEL, IBGE, Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e do Atlas Municipal (Recife) de Desenvolvimento Humano.

Em cada parte estão descritos os objetivos, procedimentos metodológicos, resultados e discussão. Os itens conclusões e referências se reportam ao conjunto de informações da tese. Os estudos apresentados foram realizados em concordância com as normas éticas que regem a pesquisa com seres humanos no Brasil, com o projeto de Nº CAAE 0037.0.095.000-07, aprovado pelo CEP do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, (Anexo A).

1ª PARTE

2 REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL

2.1 Aspectos da biologia e ecologia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762

A ordem Diptera compreende 85.000 espécies de insetos das quais aproximadamente 200 podem atuar como vetores de agentes (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) causadores de doenças ao homem (ELDRIDGE; EDMAN, 2000). A família Culicidae está composta por mais de 3.300 espécies de mosquitos distribuídas em 41 gêneros e pelo menos seis deles são de grande importância médica, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Haemagogus* e *Sabethes* (ELDRIDGE; EDMAN, 2000; FORATTINI, 1962, 1965; SERVICE, 2004). No gênero *Aedes*, estão representadas aproximadamente 900 espécies distribuídas em 44 subgêneros, sendo um dos mais importantes o *Stegomyia* (CLEMENTS, 1999; FORATTINI, 1962).

A. aegypti originário da região etiópica dispersou-se para áreas onde a atividade antrópica e o clima favoreceram a sua proliferação e atualmente pode ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais do globo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1962). Com base em caracteres morfológicos e comportamentais existem duas subespécies, *Aedes aegypti aegypti*, também chamada de forma doméstica, eusintrópica, cujas formas adultas possuem coloração mais clara e as fêmeas ovipositam em recipientes artificiais. Ocorre no leste da África e é geneticamente similar às populações das áreas tropicais e subtropicais do globo. A segunda subespécie é *Aedes aegypti formosus*, a forma silvestre que representa o ancestral Tipo, os adultos são bastante escuros e depositam os ovos em ocos de árvores, ocorre na África, ao sul do deserto do Saara, e as populações distribuídas na Ásia e sudeste dos Estados Unidos estão mais relacionadas com esta forma silvestre (TABACHNICK; POWELL, 1979). A primeira subespécie desenvolveu evolutivamente um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, sendo reconhecida entre os culicídeos como a espécie mais associada ao homem (NATAL, 2002). Essa espécie possui um curto ciclo biológico com duração de 15 a 30 dias, em regiões tropicais (BESERRA *et al.*, 2006) que compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1).

As fêmeas se alimentam preferencialmente do homem e por isso apresentam alto grau de antropofilia. Os picos de atividade hematofágica ocorrem durante o período matutino e vespertino (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após a digestão da alimentação sangüínea, que se dá entre 48 e 72 horas, as fêmeas procuram locais ou recipientes que possam acumular água, geralmente pobre em matéria orgânica, onde depositam seus ovos, isoladamente, nas paredes internas, próximos à lâmina d'água. A maior atividade de oviposição se dá nas primeiras horas do dia e ao anoitecer (CLEMENTS, 1999). Depois de um período embrionário de aproximadamente três dias, as larvas eclodem dando início ao desenvolvimento das formas jovens; porém, em condições ambientais adversas, sobretudo relacionadas à ausência de água, os ovos podem entrar em quiescência (dormência), um período de interrupção do processo final de maturação embrionária promovido pela redução drástica da umidade relativa do micro-ambiente, e permanecer viáveis no ambiente por mais de um ano (SILVA; SILVA, 1999; SOTA; MOGI, 1992a; 1992b). Este último aspecto se reveste de grande importância por representar a principal forma de permanência e dispersão passiva desta espécie no ambiente. A quantidade de ovos postos por fêmea/ciclo gonadotrófico pode variar bastante, com médias que vão de 32 até 90 ovos (ALMEIDA, 2003; BRIEGEL, 1990; CANYON *et al.*, 1999).

O processo de dispersão de *A. aegypti* tem ocorrido principalmente de forma passiva, através da disseminação de ovos resistentes à dessecação que ficam aderidos a parede interna de recipientes de naturezas diversas com capacidade de acumular água temporariamente (FORATINNI, 1962). Esta é uma característica importante que contribui para a presença silenciosa do mosquito no ambiente. Além disto, as fêmeas tendem a distribuir pequenos grupos de ovos de um mesmo ciclo gonadotrófico em mais de um criadouro, comportamento que potencializa sua dispersão e dificulta as ações de controle (REITER *et al.*, 1997). Estudos sobre a dispersão do *A. aegypti* (soltura e recaptura) realizados no Brasil demonstram que as fêmeas podem se distanciar até 800 m do ponto de liberação em busca de sítios de oviposição (HONÓRIO *et al.*, 2003). A dispersão ativa em busca de sítios de oviposição e de hospedeiros representa um mecanismo pelo qual a fêmea do mosquito pode adquirir e disseminar agentes causadores de doenças ao homem, aspecto de grande importância epidemiológica (GUBLER; CLARK, 1995; HONÓRIO *et al.*, 2003).

Para Harrington *et al.* (2005), a distância média de dispersão é um parâmetro de maior significado epidemiológico do que a distância máxima, porque reflete o deslocamento que

potencialmente muitos dos indivíduos (fêmeas) farão ao longo de suas vidas, em busca de sítios de oviposição ou de hospedeiros. A maioria dos estudos sobre dispersão tem concluído que a distância média que esta espécie percorre pelo vôo é quase sempre inferior a 100 m (GETIS *et al.*, 2003; ORDONEZ-GOZALES, 2001; TSUDA *et al.*, 2001).

Os locais preferenciais para o desenvolvimento das formas jovens dessa espécie são habitats aquáticos instáveis, naturais ou artificiais, preenchidos por águas pluviais (occos de árvores, folhas, garrafas, latas, pneus, vasos/pratos de planta, calhas) ou os destinados ao armazenamento de água para uso doméstico, como por exemplo, cisternas, caixas d'água, tanques, tambores, tonéis entre outros (FORATTINI, 1962). Em áreas com problemas de abastecimento de água, os últimos tipos de criadouros representam os principais depósitos colonizados (MACIEL-DE-FREITAS, 2007; MELO-SANTOS *et al.*, 2001b; SILVA *et al.*, 2006). Associado a esta situação, o sistema produtivo industrial moderno gera uma grande quantidade de recipientes descartáveis, entre plásticos, latas e outros materiais, cujo descarte inadequado em quintais, ao longo das vias públicas, nas praias e em terrenos baldios, tem contribuído para a proliferação do *Aedes* (TAUIL, 2001).

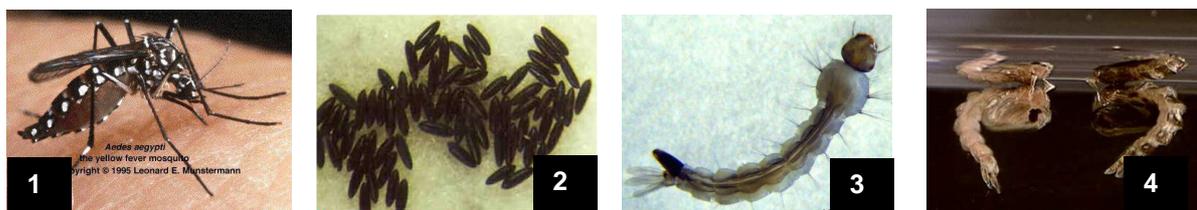


Figura 1 - Fases que compõem o ciclo evolutivo de *Aedes aegypti*.

Nota: (1) mosquito adulto; (2) ovos; (3) larva; (4) pupas.

Fonte: (1) Munstermann (1995), (2) Melo-Santos (2000a), (3) Russell; (2000), (4).Vieira (2008).

Elevada viabilidade tem sido referida para ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Beserra *et al.* (2006) constataram que para populações de *A. aegypti* da Paraíba, o percentual de eclosão das larvas variou de 61,9% a 78,6%. Estes autores concluíram em seus experimentos que situações ambientais em que a temperatura oscila entre 22° a 30° C ocorre um aumento da longevidade das fêmeas, do número de ovos postos/fêmea e do número de gerações anuais, que pode chegar a 24 gerações/ano. Silva e Silva (1999) estudaram a influência da dessecação

sobre a viabilidade de ovos de *A. aegypti* em laboratório e observaram que 85% deles podem se romper após três dias de quiescência, quando em contato com a água, e menos de 10% podem sobreviver por até 492 dias. A eclosão das larvas, segundo os autores, se dava em grupos, ao longo de aproximadamente 10 dias, gerando populações com proporções sexuais de 1:1. Estas observações permitem entender como o aparecimento das primeiras chuvas de verão, em condições de temperatura que variam de 27° a 30° C podem levar a um rápido aumento das populações de *A. aegypti* em campo, mesmo em áreas sob intervenções de controle (REGIS *et al.*, 2008). Os mosquitos de um modo geral são insetos “r-estrategistas” cuja sobrevivência de populações está baseada na capacidade de colonizar estes habitats instáveis aliada ao curto ciclo geracional e elevada fecundidade/fertilidade. A associação destas características favorece o rápido crescimento populacional, gerando acentuadas flutuações temporais de densidade (SCHOFIELD, 1991).

Diversos estudos relatam a influência da sazonalidade no crescimento populacional de *Aedes* spp. e têm levado ao reconhecimento de diferentes padrões em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, como consequência das variações climáticas, sobretudo da pluviometria e temperatura (ALTO; JULIANO, 2001; SCOTT *et al.*, 2000; SERPA *et al.*, 2006; TOMA *et al.*, 2003; VEZZANI; VELASQUEZ; SCHWEIGMANN, 2004). A maioria deles evidencia o aumento populacional de *A. aegypti* nos períodos mais chuvosos (MICIELI; CAMPOS, 2003; MOGI *et al.*, 1988). No Brasil, pelo menos dois padrões de crescimento populacional já foram descritos para regiões com condições climáticas diferentes, o primeiro e mais representativo deles, refere o aumento populacional durante o verão, quando ocorrem chuvas intensas e esparsas associadas a elevadas temperaturas (GLASSER; GOMES, 2002; SOUZA-SANTOS, 1999) e o segundo na estação de chuvas propriamente dita (PINHEIRO; TADEI, 2002; REGIS *et al.*, 2008; RÍOS-VELÁSQUEZ *et al.*, 2007). Alguns estudos têm chamado a atenção para a importância do período de transição entre as estações e seu papel na manutenção e aumento inicial do crescimento populacional, sobretudo em áreas onde os criadouros mais frequentes são reservatórios domésticos do tipo tonel, tanque, caixa d'água e outros, que estão sempre presentes no ambiente domiciliar (RÍOS-VELÁSQUEZ *et al.*, 2007; REGIS *et al.*, 2008). De acordo com estes autores, a baixa precipitação verificada neste período é suficiente para dar início à abertura dos ovos quiescentes, deixados no ambiente durante a estação seca, e a presença dos criadouros mais estáveis, citados anteriormente, para dar suporte ao crescimento lento e progressivo da população de *Aedes*. Assim, o período de transição das estações é apontado nestes estudos como o momento desencadeador do

crescimento populacional e, portanto, a ocasião mais indicada para a intensificação das ações de vigilância e controle de *A. aegypti* (REGIS *et al.*, 2008; RÍOS-VELÁSQUEZ *et al.*, 2007).

2.2 *Aedes aegypti*: importância epidemiológica como vetor de dengue

Mais de 20 dos 100 tipos de arboviroses humanas podem ser transmitidas por espécies de *Aedes*, dentre elas dengue, febre amarela e as encefalites Rocio, Japonesa e Saint Louis (ELDRIDGE; EDMAN, 2000; MONATH, 1988). Pelo menos cinco espécies de *Aedes* podem estar implicadas na transmissão do vírus dengue, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* Skuse 1894, *Aedes polynesiensis* Marks 1954, *Aedes pseudoscutellaris* Theobald 1910 e *Aedes horrescens* Edwards 1935 (RAJU, 2003).

Sabe-se que aproximadamente 2/3 da população mundial vive em áreas infestadas por potenciais vetores de dengue, principalmente *A. aegypti*. Considerando a ampla dispersão geográfica desta espécie e a circulação dos sorotipos virais na maioria dessas áreas, estima-se que 80 milhões de pessoas sejam infectadas a cada ano. A dengue é considerada endêmica em quase todos os continentes, exceto na Europa (PINHEIRO; CORBER, 1997).

A emergência ou reemergência da dengue em países do hemisfério ocidental tem ocorrido desde 1960, em epidemias explosivas com taxas elevadas de morbidade e mortalidade (PINHEIRO; CORBER, 1997). Fatores relacionados à intensa movimentação humana, ocupação desordenada dos grandes centros urbanos, ineficiência dos sistemas de vigilância epidemiológica da doença e ampla distribuição vetorial concorreram para a rápida disseminação territorial do vírus (KUNO, 1995; TAUILL, 2001). Outro aspecto relevante, especialmente para os países das Américas, inclusive o Brasil, que haviam erradicado *A. aegypti* nas décadas de 50 e 60, foi a permanência de pontos residuais de infestação pelo vetor e a descontinuidade das ações implementadas na campanha para eliminação da febre amarela (GLUBER, 1995).

Nas Américas, após a reintrodução dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 nos anos 1960, seguiu-se um período de várias epidemias de dengue clássico, registradas predominantemente na Jamaica, Martinica, Curaçau, Antiguas, Porto Rico, Venezuela, Colômbia, Caribe, Guiana Francesa. Na década de 1970, o DENV-1 foi detectado na Jamaica, disseminando-se

rapidamente para todas as ilhas do Caribe. No início de 1980, o DENV-4 foi isolado nas Américas circulando intensamente em alguns países, como Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Porto Rico, Venezuela e em menor proporção no Brasil (PINHEIRO, CORBER, 1997).

Embora as epidemias acontecessem em todos os países mencionados, Cuba foi o primeiro a registrar casos hemorrágicos da doença associados ao DENV-2, em 1981, com 158 óbitos (KOURI *et al.*, 1989). No período de 1989 a 1996, casos hemorrágicos fatais passaram a ser notificados em 26 países, destacando-se a Venezuela com 207 casos, Cuba (158), México (55), Porto Rico (37), Brasil (26), Nicarágua (19), República Dominicana (14) e El Salvador (12) (PINHEIRO; CORBER, 1997).

A primeira epidemia de dengue clássico no Brasil ocorreu em Roraima, Boa Vista, em 1982, tendo sido isolados, na ocasião, o DENV-1 e DENV-4 do vírus (OSANAI, 1983). Entretanto, foi a partir da introdução do DENV-1, no Rio de Janeiro, em 1986, que a doença tomou proporções maiores no país (NOGUEIRA *et al.*, 1989). No ano seguinte, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Alagoas, Pernambuco e Ceará também vivenciaram epidemias associadas ao mesmo sorotipo. Em 1990, surgiram os primeiros registros de dengue hemorrágico no estado do Rio de Janeiro, tendo sido detectada a presença do DENV-2 (NOGUEIRA *et al.*, 1990). De 1990 a 1992 a doença se expandiu rapidamente para outras áreas do território brasileiro.

No período compreendido entre 1982 a 1998 todos os estados brasileiros estavam infestados pelo *A. aegypti* e em 23 deles a transmissão viral estava estabelecida, com circulação simultânea dos sorotipos 1 e 2 em 19 estados, nove deles situados no Nordeste (BRASIL, 2006). O número de notificações da doença acumulado no mesmo período foi de 1.672.883 casos, dos quais 848.775 ocorreram no Nordeste, predominantemente nos estados de Pernambuco, Bahia, Paraíba e Ceará (BRASIL, 2006).

Em Pernambuco, os primeiros casos de dengue associados ao DENV-1, por transmissão local foram notificados e confirmados em 1987, em 32 dos 174 municípios que compõem o estado, entre eles Recife e Jaboatão dos Guararapes. De 1988 a 1994 não foram registrados casos autóctones de dengue, diferente da situação observada a partir de 1995. Atualmente, a transmissão autóctone da doença ocorre em todos os municípios (Figura 2)

(CORDEIRO, 2008). Análises filogenéticas identificaram que os genótipos do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 que circularam nos municípios pernambucanos de 1996 a 2006, foram América/África, Sudeste Asiático e Índia Subcontinental, respectivamente (CORDEIRO, 2008). As epidemias de dengue em Pernambuco ocorreram em: 1995/1996, com predominância do DENV-2, 1997/1998 com o DENV-1 e 2002 com o DENV-3 (CORDEIRO, 2008). Como em outros estados brasileiros, a introdução dos sorotipos e as epidemias, em Pernambuco, tiveram início na Região Metropolitana e se interiorizaram posteriormente. Da mesma forma, a evolução da infestação por *A. aegypti* também ocorreu da Região Metropolitana para a Zona da Mata, Agreste e Sertão.

A taxa de letalidade da dengue em Pernambuco de 1996 a 2006 foi de 5,4%, similar à observada no Brasil, que é de aproximadamente 4,4%, ambas consideradas elevadas quando comparadas a outros países que já convivem com a doença há mais de 20 anos (BRASIL, 2006; CORDEIRO, 2008).

Um estudo pioneiro em alguns municípios de Pernambuco demonstrou, através do diagnóstico molecular, que os sorotipos 1, e 3 do vírus Dengue circulavam nas populações de *A. aegypti* do Recife, no período de 2004 a 2006. O diagnóstico da infecção vetorial revelou ainda a ocorrência local da transmissão transovariana do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 nas populações de *A. aegypti* e DENV-1 na de *A. albopictus* (GUEDES, 2006). Diversos estudos têm referido a transmissão transovariana em campo (GUNTHER *et al.*, 2007; joshi; singhi; chaudhary, 1996; KHIN; THAN, 1983; KOW; KOON; YIN, 2001). Outros relatos sobre vigilância virológica em populações brasileiras de *A. aegypti* têm revelado a presença predominante do DENV-3, em mosquitos adultos, em detrimento dos demais sorotipos desde sua introdução (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2005).

O perfil epidemiológico da doença tende a se agravar nos próximos anos em função do esgotamento do estoque de indivíduos susceptíveis nas populações humanas dos grandes centros urbanos, constatado por inquéritos soroepidemiológicos, que revelam uma prevalência para dengue de mais de 50% nos municípios brasileiros investigados (TEIXEIRA *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 1998; 1999). Associado a este fato, a circulação de três sorotipos e a iminência de entrada do DENV-4, aumentam o risco da ocorrência de epidemias de dengue hemorrágico nos estados brasileiros.

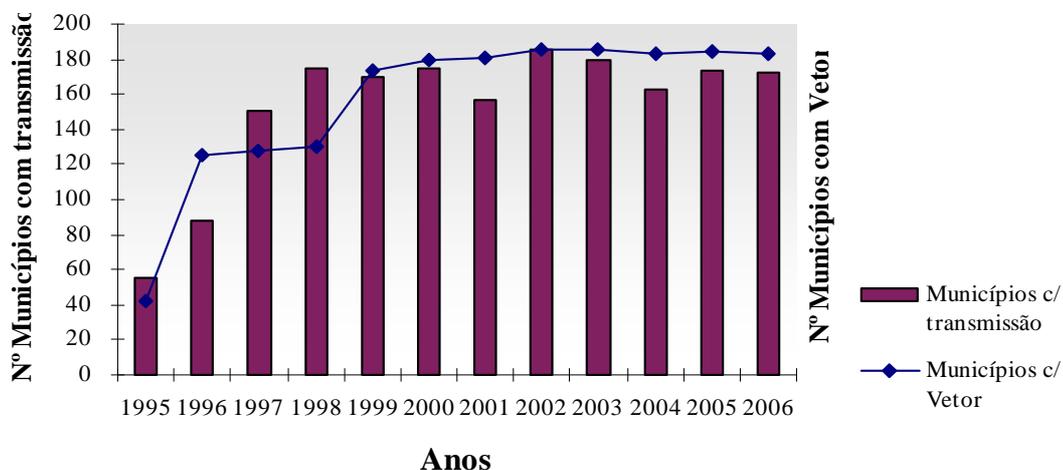


Figura 2 - Municípios pernambucanos infestados por *Aedes aegypti* e com transmissão autóctone do vírus dengue, 1995 a 2006.

Fonte: Cordeiro (2008).

A presença de *A. albopictus* no Brasil desde 1986 é outro aspecto relevante epidemiologicamente uma vez que estudos comprovam sua susceptibilidade aos quatro sorotipos virais (MILLER; BALLINGER, 1988) e sua capacidade vetorial para a manutenção da transmissão da dengue em países do sudeste Asiático (RUSSELL *et al.*, 1969; SERVICE, 2004). Outros estudos mostram o encontro desta espécie naturalmente infectada com o vírus dengue, durante uma epidemia da doença no México (IBANEZ-BERNAL *et al.*, 1997). No momento, *A. albopictus* não foi caracterizado como vetor de dengue no Brasil (DEGALLIER, 2003) o que não exclui a possibilidade do seu envolvimento com outras arboviroses. A capacidade de colonizar ambientes urbanos, rurais e silvestres apresentada por este culicídeo tem chamado a atenção, especialmente em países como o Brasil, onde a febre amarela silvestre ocorre de forma endêmica, porque tal comportamento pode favorecer o deslocamento de mosquitos infectados deste ambiente para o urbano, aumentando assim, o risco de reurbanização da febre amarela no território brasileiro (ALBUQUERQUE *et al.*, 2000; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; GOMES, 1998). Esta espécie tem sido encontrada em grandes centros urbanos, desenvolvendo-se nos mesmos criadouros

usados por *A. aegypti* (O' MEARA *et al.*, 1995; HONÓRIO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2001).

Fatores ambientais ligados à forma de ocupação do espaço geográfico e ao clima, principalmente chuva e temperatura, podem influenciar a dinâmica populacional de *A. aegypti* e, conseqüentemente, o contexto da reemergência da dengue (GUBLER, CLARK, 1995). A urbanização desordenada e o saneamento básico inadequado, particularmente quanto ao abastecimento de água e à coleta de lixo, têm levado a um aumento no número de criadouros potenciais de *A. aegypti* (TAUIL, 2001). Em climas caracterizados por variações sazonais, pode haver períodos favoráveis à intensa proliferação do mosquito, de forma que estas flutuações fazem com que as epidemias se manifestem em épocas específicas do ano, como por exemplo, no Brasil, onde um maior número de casos tende a ser notificado de janeiro a junho de cada ano (MARQUES *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2002, 2005). Certamente outros fatores além da abundância do vetor, como nível de imunidade coletiva das populações humanas, densidade demográfica, distribuição e movimentação de pessoas, estão associados à ocorrência de casos da doença (GETIS *et al.*, 2003; GUBLER; KUNO, 1997).

2.3 Programas de controle de *Aedes aegypti*: a experiência do Brasil

O controle de *A. aegypti* no Brasil ocorria de forma assistemática desde a confirmação de sua reintrodução no território nacional em 1976 (SUPERINTENDÊNCIA DAS CAMPANHAS DE SAÚDE PÚBLICA, 1988). Vinte anos depois (1996), foi lançada a primeira versão de um programa verticalizado, estruturado a nível central (federal) para todo o Brasil, intitulado Programa para Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa). Este programa, tecnicamente baseado nos princípios do SUS de descentralização das ações para estados e municípios, foi estruturado em três pilares, controle vetorial, saneamento e educação (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). As ações de combate ao vetor estavam voltadas principalmente às formas aquáticas do mosquito, através da eliminação mecânica de criadouros potenciais pela destruição de depósitos inservíveis e coleta sistemática de resíduos sólidos do ambiente, e o uso de inseticidas químicos organofosforados (temefós) para tratamento dos demais depósitos inclusive aqueles destinados ao abastecimento doméstico.

O controle das formas adultas do mosquito, pela aplicação perifocal e espacial (nebulização), em Ultra Baixo Volume (UBV), de inseticidas organofosforados (malathion, fenitrothion) e piretróides (cipermetrina e deltametrina) (Figura 3), passou a ser praticado, a princípio, apenas nos períodos epidêmicos ou na iminência dos mesmos, com o objetivo de reduzir a transmissão viral, como preconizado pela Organização Mundial de Saúde (1995a; 1995b) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). Esta medida passou a ser clamada e entendida equivocadamente pela população como forma eficaz de controle do mosquito, talvez pela redução do incômodo causado pelas picadas de *A. aegypti* e outros mosquitos presentes no ambiente domiciliar, o que certamente contribuiu para seu uso de forma inapropriada. Sabe-se que os níveis de redução da população de mosquitos através de adulticidas são considerados insatisfatórios em termos de controle (CHADEE, 1990) e que seu uso continuado pode acelerar o aparecimento da resistência (MONTELLA *et al.*, 2007).

Na prática, as ações de controle vetorial do PEAa alcançaram pouco êxito em termos de contenção da dispersão geográfica do vetor e de redução da transmissão da doença (AUGUSTO; CARNEIRO; MARTINS, 2005; BRAGA; VALLE, 2007; DONALÍSIO; GLASSER, 2002; SANTOS, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Em 2001 o programa foi reestruturado passando a se chamar Programa de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001), com ações voltadas à redução dos níveis de infestação vetorial e sua intensificação nas áreas consideradas mais críticas, representadas por 657 municípios e não (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). O insucesso do PEAa, segundo Braga e Valle (2007), foi atribuído à “elevada complexidade de estabelecer e universalizar medidas de erradicação no contexto dos diversos municípios brasileiro”.

Apesar da mudança de objetivo, a prática de controle vetorial no programa permaneceu centrada, quase que exclusivamente, na aplicação de inseticidas nos criadouros residenciais, com pouca ou quase nenhuma mobilização social no sentido de manter o ambiente livre de criadouros potenciais do mosquito. Estima-se que em 2002, mais 800 de milhões de reais, ou seja, cerca de 80% dos recursos destinados à dengue, tenham sido empregados para vigilância e controle vetorial, sobretudo para aquisição de inseticidas e máquinas pesadas para sua aplicação em UBV (BRAGA; VALLE, 2007a). Enquanto isso, apenas 9,7% foi empregado em saneamento e 8,1% em comunicação, educação em saúde e mobilização social (AUGUSTO; CARNEIRO; MARTINS, 2005).

Em 2002, mais de 3.500 dos 5.560 municípios brasileiros estavam infestados por *A. aegypti* (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Uma nova versão do programa, intitulada Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) passou a vigorar no final de 2002, em caráter permanente, composta por 10 componentes (AUGUSTO; CARNEIRO; MARTINS, 2005; BRAGA; VALLE, 2007a).

Experiências com o uso extensivo, intensivo e exclusivo do larvicida temefós sem rotatividade com outros agentes de controle têm levado à seleção de populações de *A. aegypti* resistentes a este composto em diversos países, inclusive no Brasil (ANASTÁCIO, 2002; BRAGA, *et al.*, 2004; BRAGA; VALLE, 2007; GEORGIOU *et al.*, 1987; LIMA, 2003; MACORIS *et al.*, 1999; MONTELA *et al.*, 2007; RAWLINS, 1998b; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Assim, após a constatação de falhas operacionais inerentes à resistência, produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) passaram a ser utilizados a partir de 2000, em substituição ao temefós apenas nos locais onde foi confirmada a resistência. Em 2000 foi criado um componente para o monitoramento e investigação da resistência aos inseticidas empregados no PNCD, intitulado Rede de Monitoramento Nacional de Resistência de *Aedes aegypti* aos inseticidas (MoReNAa). Os primeiros relatos deste monitoramento indicaram que, em algumas populações analisadas, o mecanismo envolvido com a resistência aos inseticidas organofosforados usados é do tipo metabólico, mais especificamente associado às alterações nas enzimas detoxificadoras esterases e glutatona-S-transferase (GST) (BRAGA; VALLE, 2007b; MONTELA *et al.*, 2007). Outros estudos já indicavam o envolvimento das esterases, sobretudo na resistência ao temefós (PAIVA, 2006) e revelavam que a interrupção do uso do produto estava se dando de forma tardia, visto que muitas populações caracterizadas como resistentes em 2002/2003 ainda permaneciam resistentes mesmo após quatro anos de substituição do produto (GOMES, 2006).

Nas últimas décadas, o controle integrado de *A. aegypti* tem sido recomendado diante do reconhecimento da falta de sustentabilidade dos programas baseados no uso quase que exclusivo de inseticidas químicos (AUGUSTO; CARNEIRO; MARTINS, 2005; DONALÍSIO; GLASSER; 2002; HALES; PANHIUS, 2005). Um programa para controle de *A. aegypti* prescinde de ações descentralizadas e intersetoriais, além da participação comunitária ativa e permanente, especialmente no que diz respeito à mudança de comportamentos individuais ou coletivos que levem ao aparecimento de criadouros do mosquito. Países como o Vietnã têm combinado com sucesso a abordagem vertical e

horizontal e estabelecido estratégias baseadas no manejo ambiental com participação ativa das comunidades, utilizando copepodos como agentes biológicos de controle, para reduzir as populações de *A. aegypti* e priorizando o controle de recipientes de acordo com sua frequência e produtividade (KAY; NAM, 2005). De acordo com alguns estudos, programas desta natureza devem levar em conta a realidade e a percepção de risco da população local quanto à doença e ao vetor, manter um elo de comunicação entre comunidade e serviço público, aumentar o grau de confiança entre eles, além de estimular a comunidade a exercer seus direitos e deveres (AUGUSTO; CARNEIRO; MARTINS, 2005; VALLA, 1998; SPIEGE; YASSI; TATE, 2002; STOTZ, 1993; TOLEDO-ROMANI *et al.*, 2006).

Estudos qualitativos sobre as percepções comunitárias das formas de transmissão, controle e prevenção da dengue, e do seu papel neste processo, têm um caráter estratégico para a estruturação dos programas. No Brasil, tais estudos são unânimes em afirmar que o ganho de conhecimento adquirido no processo de assimilação das informações das campanhas não tem correspondido a uma mudança efetiva nos hábitos (comportamentos) da população, contrariando o principal objetivo da ação educativa (CLARO *et al.*, 2004; CHIARAVALLOTI *et al.*, 2003; FRANÇA *et al.*, 2004). Esta incoerência tem sido explicada de várias maneiras, desde a falta de reconhecimento dos riscos associados à doença e à presença contínua do mosquito nos ambientes urbanos; a dificuldade de impedir a infestação de recipientes domésticos por estes insetos, sobretudo em função dos problemas de abastecimento de água, até aos erros na opção pedagógica adotada para a divulgação das informações sobre a doença e o mosquito (CHIARAVALLOTI-NETO *et al.*, 2003; LEFÈVRE *et al.*, 2004). As mensagens educativas têm veiculado sentidos abstratos que não se conectam ao cotidiano da população, assim, sua participação tem se resumido, timidamente, às campanhas de limpeza (“arrastões”) para a eliminação de recipientes artificiais inservíveis (pneus, vasos de planta, latas, garrafas e outros utensílios descartáveis), considerados criadouros potenciais das formas jovens do *A. aegypti*.

Experiências em várias partes do mundo têm mostrado que a participação ativa da comunidade tem sido um diferencial para o êxito em programas de controle de *A. aegypti* (ROSEBAUM *et al.*, 1995; SPIEGE; YASSI; TATE, 2002; SWADDIWUDHIPONG *et al.*, 1992; TOLEDO-ROMANI *et al.*, 2006; WINCH *et al.*, 1991).

Para a compreensão das epidemias e direcionamento das ações de controle, é fundamental conhecer os fatores que influenciam a densidade de mosquitos, tais como a estrutura urbana de saneamento, os aspectos sócio-econômicos e culturais das comunidades humanas, pois deles dependerão a estocagem de água, tipos de utensílios utilizados, forma de descarte de materiais inservíveis, características das edificações, deslocamentos de mercadorias, entre outros (DONALÍSIO; GLASSER, 2002). Alguns estudos têm buscado avaliar o componente entomológico, quanto à efetividade das ações no controle populacional do *A. aegypti*, e suas relações com macrofatores ambientais, sociais e culturais que caracterizam os diferentes espaços urbanos.



Figura 3 – Aplicação perifocal de inseticidas químicos.

Nota: (a) máquina pesada para aspersão espacial em ultra baixo volume (UBV), (b) máquina costal.

Fonte: Avillis (2008).

2.3.1 Vigilância entomológica de *Aedes aegypti*

A vigilância entomológica desempenha papel decisivo na avaliação do impacto das medidas de controle sobre a população do inseto vetor e no redirecionamento das ações (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; GOMES, 2002). O primeiro e mais importante aspecto para a estruturação das ações de controle é a identificação dos criadouros preferenciais da espécie alvo. Inquéritos entomológicos realizados no Brasil revelam que os reservatórios externos como caixas d'água, tanques, tonéis, tambores e jarras estão frequentemente positivos para formas jovens do mosquito, sobretudo nas regiões Nordeste e Sudeste do País, onde existem problemas com o abastecimento de água (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000;

MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2006). No intradomicílio, os criadouros preferenciais são vasos e pratos de plantas (MACORIS *et al.*, 1997).

Os índices mais utilizados para o monitoramento de *A. aegypti* em programas de controle são o Índice de Infestação Predial (IIP) e o Índice de Breteau (IB). Ambos estão baseados na presença/ausência de recipientes contendo larvas/pupas do mosquito (criadouro) no imóvel, unidade territorial de amostra, e não consideram a densidade/produtividade destes criadouros (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996; GOMES, 1998). Apesar de serem mais reprodutíveis, são operacionalmente laboriosos e dependem em grande medida da habilidade do operador em localizar os possíveis criadouros positivos para larvas/pupas no imóvel, ou seja, de realizar a pesquisa larvária (Figura 4A). Um aspecto muitas vezes negligenciado com relação à presença de larvas em um criadouro é que não há como afirmar que sejam representativas da população de fêmeas presentes no mesmo momento e lugar, em função da característica de quiescência dos ovos. Além disso, não são indicadores da densidade populacional de larvas nem de adultos e, portanto, apresentam grandes limitações para avaliar riscos epidemiológicos (BRAGA; VALLE, 2007a; GOMES, 1998; GUBLER; KUNO, 1997).

Tun-Lin *et al.* (1995) propõem a existência de uma pequena proporção de imóveis (<3%) que corresponde aos pontos-chaves para a manutenção dos mosquitos nas áreas infestadas, por agregarem a maioria dos criadouros (47% a 53%). Sugerem ainda que tais pontos possam ser facilmente indicados através da pesquisa larvária.

Críticas são hoje direcionadas à qualidade das informações obtidas através dos índices larvários, sobretudo devido às falhas durante o processo de investigação dos imóveis, quer pela inacurácia visual do processo de localização dos possíveis criadouros no ambiente quer pelo acesso ao próprio imóvel (DIBO *et al.*, 2005; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2007; REGIS *et al.*, 2008).

O hábito alimentar filtrador/raspador de fundos e superfícies das larvas de *A. aegypti* e sua capacidade de permanecer por períodos prolongados no fundo de reservatórios dificultam ainda mais a detecção e coleta de larvas destinadas ao seu monitoramento. Assim, métodos voltados à coleta de ovos e mosquitos adultos parecem mais apropriados às peculiaridades desta espécie (ACIOLI, 2007).

A armadilha de oviposição (ovitrampa), idealizada por Fay e Perry (1965), é considerada a ferramenta mais sensível para monitoramento de espécies de *Aedes* colonizadoras de criadouros artificiais (BRAGA *et al.* 2000; BRAGA; VALLE, 2007a). Os ovos coletados nestas armadilhas permitem o cálculo de índices que refletem a distribuição e a densidade dos mosquitos em áreas infestadas e, segundo Acioli (2007) são mais informativos do que os larvários.

As ovitrampas apresentam diversas vantagens operacionais comparada a pesquisa larvária entre elas a capacidade de detectar, por busca passiva, *Aedes* spp. mesmo quando em baixa densidade, facilidade e simplicidade de manipulação pelos agentes em campo e baixo custo associado a sua manufatura (ACIOLI 2007; BRAGA *et al.*, 2000; CHIARAVALLOTI-NETO, 1997; GAMA *et al.*, 2007; GOMES, 1998). A adição de substâncias atraentes e/ou estimulantes à oviposição, como por exemplo, infusões de gramíneas tem potencializado a eficiência desta ferramenta na detecção de diferentes espécies de *Aedes* (CHADEE *et al.*, 1993; GAMA *et al.*, 2007; POLSON *et al.*, 2002; REITER; AMADOR, COLON, 1991; RITCHIE *et al.*, 2001; SANT'ANA; ROQUE; EIRAS, 2006). A presença de telas ou substâncias adesivas que aprisionam os mosquitos adultos (AI-LEEN, SONG, 2000; CHAN *et al.* 1977; RITCHIE *et al.*, 2003) e a associação com inseticidas químicos ou biológicos que causam a morte de formas jovens e/ou adultas do mosquito (PERICH, *et al.*, 2003; REGIS *et al.*, 2008) são modificações incorporadas às ovitrampas que têm possibilitado sua utilização como ferramenta para monitoramento permanente ou para o controle complementar de populações de *Aedes*. Estudos recentes demonstram que podem ser confeccionada com material reciclado, como garrafas descartáveis (REGIS *et al.*, 2008) e até com material biodegradável (RITCHIE *et al.*, 2008).

A coleta de ovos tem como desvantagens a impossibilidade de correlacionar o número de ovos com o número de fêmeas, visto que uma fêmea pode distribuir quantidades variáveis de ovos em diversas armadilhas (CLEMENTS, 1992, 1999), e requerer a eclosão das larvas para a identificação das espécies.

Acioli (2007) em seu estudo sobre aspectos operacionais relativos ao monitoramento de *A. aegypti* pela pesquisa larvária e por ovitrampas concluiu que esta última é superior nos seguintes aspectos: visitas para instalação e inspeção menos invasivas, maior sensibilidade na detecção da espécie-alvo, informações quantitativas sobre a população vetorial, indicação de

área com maior densidade populacional do mosquito, maior facilidade de operacionalização e menor custo. Tailândia, Singapura, Vietnã e Austrália são exemplos de países que utilizam ovitrampas convencionais ou modelos adaptados para a vigilância e controle de *A. aegypti*.

O monitoramento a partir da captura de mosquitos adultos em local de repouso através de aspiradores (Figura 4B) também tem se mostrado eficiente. Além de coletar um grande número de indivíduos, este método favorece estudos sobre o estado fisiológico das fêmeas, comportamento, longevidade e outras informações relacionadas à competência e capacidade vetorial dos espécimes coletados em áreas de circulação viral (BARATA *et al.*, 2001; CLARK; SEDA; GUBLER, 1994; HOECK *et al.*, 2003; KLINE, 2006; LOWENBERG-NETO; NAVARRO, 2004), além de informações relevante sobre seu . Apesar de serem eficientes, os custos com a manutenção destes equipamentos são referidos como limitantes a sua utilização na rotina de programas de controle (GUBLER; KUNO, 1997; KROCKEL *et al.*, 2006; TIDWELL *et al.*, 1990). Este último aspecto não é um argumento válido, visto que, todos os métodos requerem algum tipo de manutenção, assim, vantagens e desvantagens devem ser ponderadas com cuidado na análise custo/benefício. Por outro lado, estudos a campo têm mostrado que alguns modelos de armadilhas para coleta de adultos (Figura 4 c1-c6) podem ser eficientes para a detecção de espécies de *Aedes*, e ainda gerar vantagens relativas aos processos de contagem e identificação dos adultos, comparado a amostras de ovos (FACCHINELLI *et al.*, 2007; GAMA, *et al.*, 2007; JONES, *et al.*, KROCKEL *et al.*, 2006; 2003; RITCHIE, 2004; RUSSELL *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006).

2.3.1.1 Armadilhas de oviposição

A armadilha de oviposição, conhecida no Brasil como ovitrampa, foi desenvolvida nos Estados Unidos, na década de 60, com a finalidade de monitorar populações de *A. aegypti* (FAY, PERRY, 1965). Apesar de sua comprovada eficiência para *A. aegypti* a ovitrampa atrai outras espécies de *Aedes* colonizadoras de recipientes temporários. A ferramenta é simples e consiste de um recipiente de cor preta contendo água e um suporte para a deposição dos ovos. Segundo alguns estudos o desempenho da armadilha pode ser melhorado pelo uso de substâncias que aumentam sua atratividade para fêmeas grávidas ou pela adição de inseticidas capazes de prolongar sua permanência em campo por períodos superiores a sete dias, sem o

risco de transforma-la em um criadouro de mosquitos (PERICH *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003).

Infusões de matéria orgânica são utilizadas como atraentes para espécies de *Aedes* em armadilhas de oviposição desde 1970 (ALLAN; KLINE, 1995; HOLCK *et al.*, 1988; KITRON *et al.*, 1989).

Diversos estudos têm comprovado a superioridade da ovitrampa comparada à pesquisa larvária, principalmente para o monitoramento de áreas não infestadas pelo *A. aegypti*, mas com alta probabilidade de servir como porta de entrada a este espécie, como por exemplo, portos e aeroportos, ou ainda com baixos níveis de infestação (BRAGA *et al.*, 2000; FAY; ELIASON, 1966; MARQUES *et al.*, 1993; RAWLINS *et al.*, 1998; VARGAS, 2002).

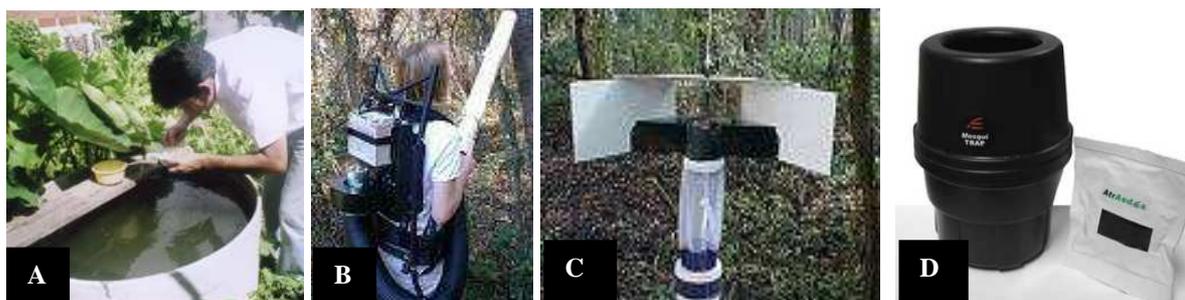


Figura 4 – Instrumentos/métodos para a coleta de formas jovens (larvas/pupas) e adultas de *Aedes aegypti*.

Nota: (A) pesquisa larvária, (B) aspirador costal para a captura de mosquitos adultos, (C) armadilha Omni-Directional Fay-Prince para a coleta de mosquitos adultos, (D) armadilha Mosquitrap para coleta de fêmeas grávidas de *Aedes*.

Fonte: Hock, J. W, (2008); Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

De acordo com Braga *et al.* (2000) a principal vantagem da ovitrampa é a capacidade de detectar precocemente a presença de espécies de *Aedes*, aumentando as chances de encontrar domicílio positivo, comparada à pesquisa larvária. Além disso, permite diferenciar áreas quanto ao nível de infestação, o que nem sempre é possível através da pesquisa larvária. Dentre os aspectos que contribuem para a eficiência dessa armadilha destacam-se a capacidade de competir com criadouros potenciais na detecção de *Aedes* spp. e possibilidade de estimar mais fidedignamente os níveis de infestação do que, por exemplo, a pesquisa

larvária, visto que *Aedes* spp. podem colonizar criadouros crípticos que não são detectados em uma inspeção de rotina (AYRES *et al.*, 2002; RAWLINS *et al.*, 1998a).

Apenas 10 anos após a idealização das ovitrampas por Fay, Perry (1966), Chan *et al.* (1977) demonstraram sua utilização para o controle complementar de *A. aegypti*, em aeroportos de Singapura. Pouco tempo depois, Cheng *et al.* (1982) referiram que a associação de ovitrampas modificadas à remoção de criadouros do mosquito promoveu uma redução de até 36% do IB em áreas de Houston, Texas. Apesar do êxito destas experiências, a idéia foi abandonada até meados de 1999, quando foi proposta a associação de palhetas impregnadas com inseticidas químicos às ovitrampas para torná-las letais às formas jovens e às fêmeas do mosquito, pelo contato durante o processo de oviposição (ZEICHNER, *et al.*, 1999). Os primeiros testes a campo com a ovitrampa letal (OL) demonstraram sua eficácia para controle de populações de *A. aegypti* em diferentes áreas geográficas (PERICH *et al.*, 2003; SITHIPRASASNA *et al.*, 2003; RITCHIE, 2005).

Estudos realizados por Santos e colaboradores (2003) revelaram a possibilidade de utilizar ovitrampas consorciadas com larvicidas biológicos para o controle de *A. aegypti*, em áreas urbanas do Recife, densamente infestadas pelo mosquito. Seus resultados indicaram que a ferramenta teve grande aceitação nas comunidades estudadas e demonstraram que a recusa ao método pareceu ser maior nos bairros com elevada condição de vida.

De acordo com Knipling (1970), a eficiência da ovitrampa parece ser inversamente proporcional ao número de criadouros no ambiente. Estudos utilizando de duas até 10 ovitrampas/imóvel mostram efeito de redução das populações de *A. aegypti*, e revelam que sua integração às ações de manejo ambiental para eliminação de criadouros favorece a manutenção de baixos níveis de infestação (CHENG *et al.*, 1982; PERICH *et al.*, 2003; RITCHIE, 2005; SITHIPRASASNA *et al.*, 2003)

2.3.2 Uso do Bti para controle de *A. aegypti*: a experiência do Brasil

A situação de infestação nos centros urbanos brasileiros tem se agravado com o aparecimento de populações de *A. aegypti* resistentes aos inseticidas químicos utilizados para

seu controle, sobretudo o larvicida temefós que tem sido aplicado extensiva e intensivamente no Programa oficial desde 1996. Esta realidade levou, em meados de 2000, aos primeiros casos de substituição do inseticida temefós por larvicidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), em localidades onde foram identificadas populações resistentes do mosquito (BRAGA; VALLE, 2007b).

A descoberta de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti), bactéria entomopatígena aeróbica esporulante se deu em 1977 (GOLDBERG, MARGALIT, 1977). Testes comprovaram sua atividade tóxica para larvas de dípteros, sobretudo de culicídeos e simulídeos (DE BARJAC, 1978). Na família Culicidae, espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora* e *Mansonia* são susceptíveis a este patógeno (DE BARJAC, 1990).

O mecanismo de ação deste patógeno é específico para larvas de algumas espécies e está relacionado a quatro proteínas com atividade tóxica encontradas em um cristal ou inclusão parasporal, produzido pela bactéria na fase de esporulação (Cry4A, Cry4B, Cry11A e CytA). Quando ingeridos pelas larvas susceptíveis, estes cristais são solubilizados no lúme intestinal, em pH alcalino, liberando as protoxinas, que são clivadas por enzimas proteolíticas em fragmentos menores transformando-os em toxinas ativas (CHARLES, 1983). As toxinas atuam sinergicamente e interagem com receptores da membrana apical do intestino médio, causando sérios danos ao epitélio, que culminam com a morte da larva (ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992; CHARLES, 1981; GILL; COWLES; PIETRANTONIO, 1992). As toxinas agem sinergicamente para a completa expressão da toxicidade (CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995). O tempo requerido para expressão máxima da toxicidade é de 24 horas após a exposição.

Bti é encontrado naturalmente no solo, em ambientes aquáticos e em cadáveres larvais de insetos. Em algumas circunstâncias os cadáveres larvais servem como ambiente favorável ao crescimento e multiplicação da bactéria, ou seja para sua reciclagem (ALY, 1985; ALY; MULLA; FEDERICI, 1985; KHAWALED; BARAK; ZARITSKY, 1988).

Sua adoção, alguns anos depois da descoberta, em amplos programas de controle de simulídeos e culicídeos (ARAÚJO-COUTINHO, 1995; BECKER *et al.*, 1991; HOUDGARD *et al.*, 1997; MARDINI *et al.*, 2000), representa um importante marco na história do controle

dos vetores de interesse em saúde pública (REGIS *et al.*, 2001). Sua inocuidade para a fauna não alvo presente nos criadouros destas espécies tem sido demonstrada (BOISVERT; BOISVERT, 2000; GARCIA, DES ROCHERS, TOZER, 1980).

Há evidências que o Bti também pode se reciclar em organismos não alvo. Manasherob *et al.* (1998) observaram, em vacúolos do protozoário *Tetrahymena pyriformis*, crescimento bacteriano e produção de esporos e toxinas de Bti, capazes de causar mortalidade em larvas *A. aegypti*. Entretanto, ainda há controvérsias sobre a capacidade de reciclagem do Bti em condições de campo (MULLA, 1990).

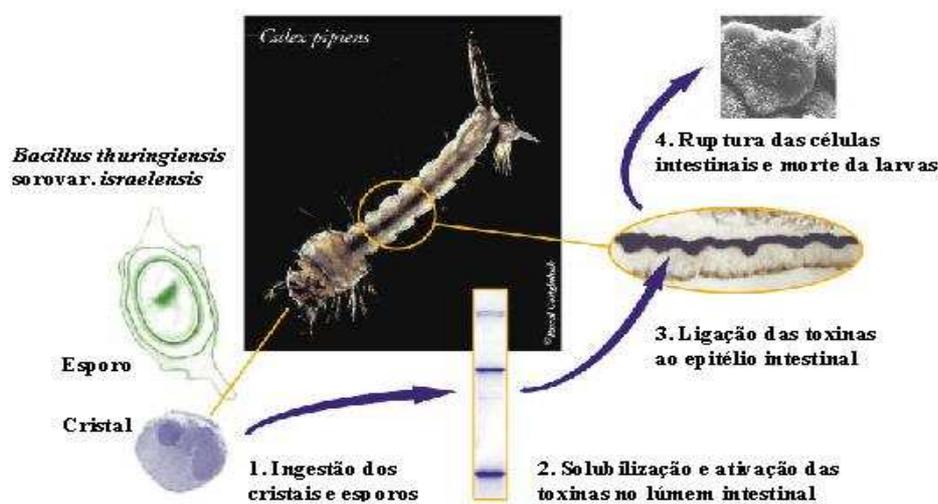


Figura 5. Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* em larva de mosquito.

Fonte: Modificado de Regis *et al.* (2001).

2.4 Produção e formulação de bactérias entomopatogênicas

Dentre os diferentes processos fermentativos empregados na produção do Bti, o mais usual é o processo submerso descontínuo, no qual o meio nutritivo líquido é utilizado para suspender e propagar a biomassa bacteriana. No estágio final da fermentação, as fontes de nutrientes se tornam limitantes, promovendo a esporulação e posterior liberação de cristais e esporos no meio de cultura. Assim, a cultura final contém uma suspensão de células remanescentes do processo, fragmentos celulares, além de esporos e cristais (BRYANT, 1994). Na escala de produção o passo seguinte é a recuperação do princípio ativo por

centrifugação, floculação e micro filtração (COUCH, 2000; LUNA; LOPES; MASSARANI, 2002). Esta é uma etapa crítica do processo de desenvolvimento, pois pode levar a perda ou redução da potência tóxica do produto (BRYANT, 1994). A centrifugação é um método bastante empregado, no entanto, pode gerar perdas de 10 a 15% dos sólidos (COUCH, 2000). A floculação é uma alternativa para recuperar os esporos e cristais bacterianos, pois permite sua conversão em grandes agregados, favorecendo a deposição gravitacional. Várias substâncias que induzem e favorecem a floculação podem ser utilizadas, como polímeros e compostos inorgânicos, que separam satisfatoriamente a biomassa (LUNA; LOPES; MASSARANI, 2002). O método mais eficiente é a micro filtração que garante a recuperação de 100% dos sólidos, mas se torna dispendioso em termos de equipamento e tempo.

Ao longo do desenvolvimento do produto, a verificação da atividade tóxica, através de ensaios com a espécie-alvo deve ser feita para garantir a qualidade do produto final, servindo como parâmetro para dar continuidade às etapas posteriores do processo de produção (HABIB; ANDRADE, 1998; HABIB; ALVES; ALVES, 1998).

Os entomoatógenos microbianos podem ser aplicados puros, isto é, em preparações sem nenhum aditivo, ou podem passar por um processo de formulação visando melhorar a sua estabilidade, dispersão, cobertura homogênea e desempenho no campo (BATISTA FILHO *et al.*, 1998). Segundo Cerón (2004), o objetivo de formular é promover uma correta combinação de substâncias inertes e ingrediente ativo para formar um produto estável, eficaz e de fácil aplicação. A seleção de substâncias adjuvantes adequadas é de extrema importância para o sucesso de uma formulação. Quando usados corretamente, estes componentes aperfeiçoam a atividade do ingrediente ativo e melhoram as características dos produtos formulados, podendo agir inclusive como fotoprotetores e fagoestimulantes. Os ingredientes inertes, diluentes, conservantes, absorventes, fotoprotetores e atrativos devem conferir ao produto propriedades que favorecem o armazenamento prolongado das formulações biológicas. Quando não escolhidos adequadamente os aditivos podem se associar ao entomopatógeno e causar perda de viabilidade e inativação do princípio ativo (BATISTA FILHO *et al.*, 1998).

Produtos industrializados à base de Bti, sob diferentes formulações, a maioria contendo cristais e esporos viáveis da bactéria como ingrediente ativo, estão disponíveis no mercado internacional (Tabela 1) (BECKER 2000; COUCH 2000). No passado, a Organização

Mundial de Saúde restringiu o uso de produtos contendo esporos viáveis de Bti em água potável, em parte por insuficiência de provas experimentais de sua inocuidade à saúde humana. Entretanto, em 1991, reconsiderou sua posição e assumiu que estes produtos eram seguros para uso em qualquer tipo de ambiente (ORGANIZACAO MUNDIAL DE SAUDE 1999). Na Alemanha existem, entretanto, leis que restringem a liberação de microorganismos com esporos viáveis na natureza, como precaução ante o possível impacto ambiental que seu uso constante possa causar (BECKER 2002). Em situações como essa, são utilizadas formulações asporogênicas, contendo apenas cristais protéicos (BECKER *et al.*, 1991; DULMAGE *et al.*, 1990). Uma dificuldade na obtenção de produtos livres de esporos é o custo do processo para sua separação dos cristais (COUCH, 2000). Entretanto, métodos químicos ou físicos podem representar uma alternativa a obtenção de produtos com esporos inativos (BECKER, 2002).

Diversos estudos têm comprovado que excelentes agentes de controle podem se tornar ineficazes se a estratégia de controle não considerar aspectos importantes ao seu desempenho em campo (MELO-SANTOS, 2001a). A adequação do tipo de formulação de Bti ao habitat e hábito do mosquito-alvo é um requisito que pode gerar ganhos operacionais, além de racionalizar o uso do agente de controle (BECKER; RETTICH, 1994; BECKER, 2000; COUCH, 2000; MELO-SANTOS *et al.*, 2001a).

A sólida base de conhecimentos sobre o Bti permite confirmar, por exemplo, sua inocuidade para outros grupos animais e segurança de seu uso continuado em larga escala. Outro fato de grande relevância prática é a ausência de registro de resistência de insetos-alvo a esta bactéria, depois de mais de duas décadas de uso (BECKER, 2000; HOUGARD, *et al.*, 1997). Entretanto, os dados relativos ao tempo de persistência da atividade larvicida do Bti em habitats aquáticos comumente colonizados por culicídeos vetores são ainda controversos.

De acordo com leis nacionais e internacionais, a quantidade de ingrediente ativo e potência do produto devem estar mencionadas no rótulo da embalagem. Estes valores devem ser mantidos com precisão em todas as remessas de produção, para estabelecer padrões e metodologias de controle de qualidade. Para isto, o monitoramento da produção deve ser feito desde o processo de fermentação até o desenvolvimento da formulação final. Por razões de segredo industrial, aspectos associados à produção em massa das bactérias entomopatogênicas são pouco publicados na literatura científica (BATISTA FILHO *et al.*, 1998; COUCH, 2000).

2.4.1 Metodologias para avaliação de biolarvicidas

Os testes sob condições simuladas de campo (TCS) são os mais empregados para avaliar e comparar diferentes produtos, bem como os fatores envolvidos na eficácia e persistência de sua atividade larvicida com maior segurança do que os testes realizados em condições reais de campo (MELO-SANTOS *et al.*, 2001b; REGIS; SILVA; MELO-SANTOS, 2000; THIÉRY *et al.*, 1999). Becker e Rettich (1994) afirmam ainda que os produtos devam ser também submetidos a testes de campo, em pequena escala (piloto), para preconizar doses e intervalos de aplicação, antes de serem incorporados à rotina dos programas de controle. A atividade residual de biolarvicidas é fortemente influenciada por fatores ambientais (BECKER, 2000; NAYAR *et al.*, 1999; THIÉRY; FOUQUE, 1998).

Um dos grandes problemas para a avaliação de larvicidas bacterianos é que não existe um procedimento padrão que permita comparar o desempenho dos produtos sob condições simuladas de campo. Em consequência, observa-se uma grande diversidade de métodos de avaliação que buscam se aproximar das condições reais de campo, sobretudo no que se refere ao uso de larvas recém eclodidas, da colonização dos recipientes tratados com as larvas ao invés do recolhimento de amostras de água destes, da permanência das larvas mortas nos recipientes, da ampliação do período de verificação da mortalidade e da avaliação da persistência pela recuperação de pupas (Tabela 2). A introdução destes elementos na avaliação tem revelado que a persistência dos produtos, em criadouros de *Ae. Aegypti* por exemplo, pode ser superior a três meses, (ARAÚJO *et al.*, 2007; BENJAMIN *et al.*, 2005; MULLA *et al.* 2004; SETHA *et al.*, 2007).

Testes realizados no Brasil com formulações líquidas e sólidas mostraram resultados variáveis quanto ao efeito residual do Bti, para o controle de *A. aegypti*, com referências que variam de 15 a 180 dias. Araújo *et al.* (2007) e Melo-Santos *et al.* (2001b) consideram que estas diferenças estejam mais associadas a falhas nos métodos empregados na avaliação dos produtos do que ao desempenho dos mesmos.

Tabela 1 - Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* disponíveis no mercado intrnacional.

Nome comercial	Formulação	Potência (UTI/mg)¹
Aquabac [®]	Pó primário	7.000
Bactimos PP [®]	Pó primário	10.000
Bactimos WP [®]	Pó molhável	5.000
Teknar [®]	Pó molhável	>10.000
Bactimos G [®]	Granulado	200
Teknar G [®]	Granulado	200
Ice cubes	Granulado de gelo	45
VectoBac TP [®]	Pó técnico	5.000
Teknar TC [®]	Pó técnico	10.000
VectoBac WDG [®]	Granulado dispersível em água	3.000
VectoBac DT [®]	Comprimido	2.250
Culindex Tab plus [®]	Comprimido	2.250
VectoBac [®] AS	Suspensão aquosa	1.200
Aquabac [®]	Suspensão aquosa	1.200
Teknar HP-D [®]	Fluido concentrado	1.200
VectoBac 12 AS [®]	Fluido concentrado	1.200
BioTouch [®]	Fluido concentrado	1.000
Bactimos [®] FC	Suspensão concentrada	600
Bt-horus SC ²	Suspensão concentrada	700

Nota: ¹UTI: unidade tóxica internacional. ²Produto desenvolvido no Brasil (Empresa Bthek), em fase de registro.
 Fonte: Modificado de Araújo (2006).

Tabela 2 - Exemplos de metodologias aplicadas à avaliação de produtos larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* para controle de *Aedes aegypti*, sob condições simuladas de campo.

Formulação	Nº Larvas (estádio)	Frequência Colonização	Tipo recipiente (volume)	Condições simuladas				Persistência dias (mortalidade)	Referências
				Sol	Sombra	Troca de água	Remoção de larvas mortas		
Comprimido	50 (L1)	3-5 dias	Plástico (40 L)	+	+	-	-	35 a 50 (\pm 90%)	Melo-Santos <i>et al.</i> , 2001a
Grânulado/comprimido	50 (L1)	7 dias	Plástico (40 L)	+	+	+	-	35 a 82 (> 80%)	Araújo, 2003
Grânulado/comprimido	40 (L3)	7 dias	Fibra vidro (250 L)	+	+	-	-	30 a 77 (> 70%)	Vilarinhos, Monerat, 2004
Comprimido	50 (L2)	7 dias	Argila (200 L)	-	+	+	-	112 (70%)	Mulla <i>et al.</i> , 2004
Grânulado	20 (L3)	3-6 dias	Plástico/ Ferro Cimento/Asbestos (100, 200 e 250L)	-	+	-	+	15 a 35 (\pm 70%)	Lima, Melo, Valle, 2005
Comprimido	50 (L2)	7 dias	Argila/plastico (50L)	-	+	+	-	166 (94%)	Benjamin <i>et al.</i> , 2005
Comprimido	50 (L1)	7 ou 30 dias	Plástico (50 L)	+	+	+	-	30 a 180 (> 90%)	Araújo <i>et al.</i> , 2007

(+) = Sim/variável investigada no teste (-) = não/variável não investigad

3 APRESENTAÇÃO DA TESE

3.1 Metodologia padrão: instrumento de coleta de amostras populacionais de *Aedes*

A armadilha de oviposição (ovitrapa) foi empregada em quatro dos cinco estudos que compõem esta tese, seja como instrumento para o monitoramento da distribuição espaço-temporal de populações de *Aedes* em ambientes urbanos, seja como ferramenta complementar para o controle desta espécie. Os modelos de ovitrapa aqui utilizados foram similares aos descritos por Santos *et al.* (2003) (Figura 6A), Regis *et al.* (2008) (Figura 6B) e Lenhart *et al.* (2005) (Figura 6C) e são basicamente compostos por um recipiente em plástico preto (vaso), preenchido com 220 ml a 2.000 ml de infusão de gramíneas (30%), utilizada como atraente para fêmeas grávidas do mosquito. A infusão de gramíneas foi preparada com material fresco em água de torneira (15 kg/l), mantido em recipiente fechado por sete dias. Uma palheta de madeira porosa (tipo duratex) fixada internamente à borda do recipiente foi utilizada como substrato para a deposição de ovos. Em cada armadilha foi usada uma palheta de 2,0 cm x 12,0 cm ou três palhetas de 5,0 cm x 15,0 cm, identificadas com o local e data da sua instalação em campo. As ovitrapas destinadas à coleta massiva de ovos do mosquito receberam como substrato uma ou três palhetas ou um pedaço de tecido (algodão cru lavado) de 17,0 cm x 58,0 cm. A instalação foi feita, sempre que possível, na área peridomiciliar em local sombreado, protegido da chuva, a uma altura de aproximadamente 1 m do chão (Figura 6E). Sempre que o tempo de permanência da ovitrapa em campo foi superior a sete dias foi adicionado 800 mg a 4,0 g de larvicida biológico à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), por ovitrapa conforme o volume de infusão. Os procedimentos para contagem de ovos, identificação de espécies e levantamento de índices entomológicos descritos a seguir foram iguais em todos os estudos.

3.1.1 Contagem de ovos

As palhetas retiradas das armadilhas foram acondicionadas individualmente em recipientes plásticos para secagem à temperatura ambiente e posteriormente, foram

observadas em microscópio estereoscópico (aumento de 40x) para a verificação da presença e contagem de ovos de *Aedes* spp (Figura 6D). Ovos operculados ou sem opérculo foram considerados na contagem.

3.1.1.1 Índices entomológicos

Os seguintes parâmetros foram estimados a partir da contagem de ovos: a) Índice de Positividade de Ovitampas (IPO), dado pelo percentual de armadilhas positivas do total de armadilhas investigadas, b) Índice de Densidade de Ovos (IDO), média aritmética do total de ovos coletados nas armadilhas positivas, e c) número médio de ovos/ovitrampa (NMO) calculado considerando o total de ovos coletados e o total de armadilhas utilizadas (positivas e negativas). O primeiro índice permite conhecer a distribuição espacial da infestação e os dois últimos a intensidade da infestação em uma área.



Figura 6. Modelos de armadilha de oviposição (ovitrampa), exemplos de instalação da ovitrampa em campo e processo para contagem de ovos de *Aedes* em laboratório.

Nota: (A) ovitrampa com 1 palheta, similar ao modelo Santos *et al.* (2003), (B) ovitrampa-sentinela com 3 palhetas, similar ao modelo Regis *et al.* (2008), (C) ovitrampa-controle com tecido, modelo adaptado Lenhart *et al.* (2005), (D) larvicida granulado à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, (E) ovitrampa instalada em área peridomiciliar, (F) detecção e contagem de ovos do mosquito em microscópio estereoscópico. No destaque, ovos de *Aedes* spp depositados em tecido de algodão.

Fonte: Melo-Santos (2000b), Regis *et al.* (2008).

3.1.2 Identificação das espécies de *Aedes*

Para estimar a abundância e frequência relativas das espécies de *Aedes* na área de estudo, palhetas com ovos coletados nas ovitrampas foram submersas em recipientes individuais, contendo infusão de gramíneas a 10% para estimular e promover a eclosão sincronizada das larvas. Após o período de 24 h as L1 obtidas foram transferidas para cubas de criação contendo 2 L de água de torneira e ração para gatos (Whiskas®). As larvas foram mantidas no Insetário do Depto de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, à temperatura ambiente de $26^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e fotofase de 12 h. Ao atingirem o 4° estágio de desenvolvimento as larvas foram fixadas sobre lâmina para identificação da espécie com base nos caracteres morfológicos do 8° segmento abdominal (Figura 7), de acordo com a chave de classificação descrita em Consoli, Lourenço-de-Oliveira (1994).

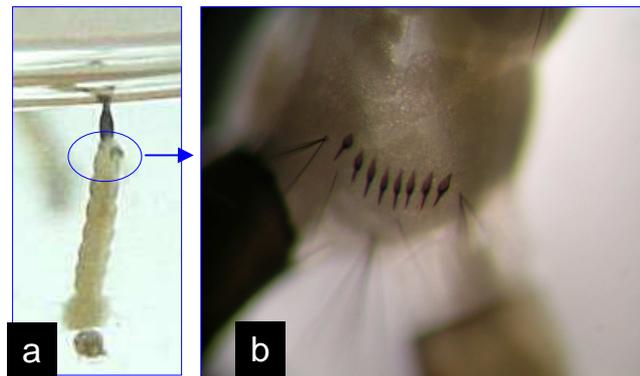


Figura 7 - Caracteres de identificação em larvas de *Aedes* spp.

Nota: (a) larva de 4° estágio com destaque para 8° segmento abdominal, (b) escamas do pecten de *Aedes albopictus*.

Fonte: Nakazawa (2006).

2ª PARTE

4. MÉTODOS PARA O MONITORAMENTO POPULACIONAL DE *Aedes* spp.

4.1 Objetivo geral

Avaliar as variações da dinâmica populacional de *Aedes aegypti* na Região Metropolitana do Recife através de armadilhas de oviposição.

4.1.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a frequência relativa e a distribuição espacial de *A. aegypti* e *A. albopictus* em áreas urbanas dos municípios de Recife e Jaboatão dos Guararapes-PE;
- b) Conhecer o perfil espaço-temporal da infestação de imóveis residenciais por *A. aegypti* em um bairro do Recife;
- c) Verificar a viabilidade dos ovos de *Aedes* spp. coletados nas armadilhas.

4.2 Estudo I: Distribuição de *Aedes* spp. em bairros do Recife e Jaboatão dos Guararapes-PE

4.2.1 Procedimentos Metodológicos

4.2.1.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido nos municípios de Recife (8°4'03"S latitude e 34°55'00" O longitude), com extensão territorial de 220 km², 94 bairros e 1.515.052 habitantes e Jaboatão dos Guararapes (8°10'00"S latitude e 35°08'00"O longitude), com 234 km², 34 bairros e 610.648 habitantes (IBGE, 2005), localizados na Região Metropolitana do Estado (Mapa 1). O clima da região é tropical úmido a subúmido, com temperatura média anual variando de 24° a 27° C e precipitação pluviométrica de 1.310 mm a 2.446 mm, com período de chuvas intensas de março a agosto, e período seco de setembro a fevereiro, com chuvas esparsas em novembro e dezembro em algumas áreas (PERNAMBUCO DE A/Z, 2008).

Estes municípios foram selecionados para o estudo de distribuição espacial de *A. aegypti* e *A. albopictus* por serem os maiores centros urbanos do Estado de Pernambuco, onde ações para controle do *A. aegypti* têm sido implementadas desde 1996. Foram selecionados aleatoriamente 166 imóveis em 18 bairros do Recife (Tabela 3), estudados em outubro de 2001 e abril de 2002, e 84 imóveis em 6 bairros de Jaboatão dos Guararapes (Tabela 4), estudados em outubro de 2002 e de 2003. Nestas ocasiões, cada imóvel residencial, do tipo casa, recebeu um par de ovitrampas (modelo descrito em SANTOS *et al.*, 2003) que permaneceu instalado no peridomicílio por um período de cinco a sete dias. Ao término deste, as ovitrampas foram retiradas e transportadas ao laboratório para a contagem de ovos, estimativa dos índices de infestação e identificação de espécies. Estas informações foram depositadas no Banco de dados do monitoramento de *Aedes aegypti* por ovitrampas (JABOATÃO DOS GUARARAPES, 2008; RECIFE, 2008). A operacionalização da instalação e recuperação das ovitrampas em campo foi realizada por agentes municipais de saúde envolvidos nas atividades do PNCD.

Os bairros de Jaboatão dos Guararapes foram caracterizados pelo método qualitativo, baseado na observação comparativa, quanto à presença de vegetação em: a) escassa, quando a vegetação era restrita a arborização de ruas e presença de terrenos baldios; b) mediana, além da arborização de ruas e terrenos baldios, presença de praças e imóveis com quintais e/ou jardins; c) abundante, além dos critérios “a” e “b”, presença de grandes espaços verdes como parques arborizados, resquícios de matas e brejos.



Mapa 1- Mapa do Estado de Pernambuco. Em destaque vermelho os municípios de Recife e Jaboatão dos Guararapes.

Fonte: Mapa... (2008).

4.2.1.2 Viabilidade dos ovos de *Aedes* spp coletados nas armadilhas

As amostras coletadas em Jaboatão dos Guararapes foram também utilizadas para a verificação da viabilidade dos ovos. Os ovos foram classificados em duas categorias: a) sem opérculo, devido à eclosão da larva ainda em campo, e b) com opérculo ou inteiros, subdivididos em viáveis e inviáveis, correspondendo respectivamente, aos ovos desidratados cujas larvas eclodiram ou não em laboratório, após serem submetidas a um único estímulo de eclosão (imersão em infusão de gramínea 10%), sete dias após a retirada das ovitrampas do campo. A taxa de viabilidade foi calculada pelo percentual de ovos sem opérculo e operculados-viáveis do total de ovos coletados no bairro.

4.2.1.3 Análise estatística

Os valores de contagem de ovos foram submetido à análise de variância (ANOVA) com testes post hoc Tukey (HSD) para comparar o nível de infestação entre as áreas estudadas. A correlação entre os índices entomológicos, IPO, IDO e o número médio de ovos foi testada pelo Coeficiente de Spearman. O teste Qui quadrado (χ^2) de proporção foi aplicado para comparar a abundância e frequência relativa das espécies de *Aedes* spp nas diferentes áreas. A correlação entre cobertura vegetal e frequência das espécies foi verificada pelo teste de Kendall. Todas as análises foram feitas considerando no mínimo um nível de 5% de significância.

4.2.2. Resultados

4.2.2.1 Nível de infestação por *Aedes* spp. nas áreas estudadas

Distribuição espacial da infestação por Aedes spp. durante o período total de observação, ovos de *Aedes* spp. foram encontrados em mais de 50% das 500 amostras coletadas nos imóveis investigados em Recife e Jaboatão dos Guararapes. Os valores de positividade de ovitrampas indicaram níveis de infestação significativamente diferentes ($p < 0,000,1$) entre os bairros nos dois municípios (Tabelas 3 e 4).

Em Recife, o percentual de ovitrampas positivas observado na estação seca (outubro/2001) foi estatisticamente maior ($p < 0,0001$) do que o registrado na estação chuvosa (abril/2002). Entretanto, não foi observada uma correlação positiva entre o IPO e a quantidade de chuvas no mês de coleta ou no mês que a antecedeu. Em setembro de 2001, por exemplo, foram registrados, no Recife, 106,3 mm de chuva em 16 dias, concentrados nos primeiros dias do mês, e em março de 2002, 409,8 mm de chuva em 25 dias (Figura 8). Na estação seca o IPO variou, entre bairros, de 31,2% a 94,4% e na chuvosa de 28,6% a 85,0%. Dos 18 bairros investigados, 15 apresentaram IPO superior a 40,0% e pelo menos 7 destes $IPO \geq 70\% \leq 95\%$, nos períodos avaliados (Tabela 3).

Em Jaboatão dos Guararapes, onde a avaliação ocorreu em outubro de 2002 e de 2003, mês compreendido no período seco de cada ano (Figura 8), foi observado um aumento de 10% no total de imóveis infestados por *Aedes* spp de um ano para o outro, e da mesma forma, uma grande variação do IPO: 15,6% a 87,5% em 2002 e 18,7% a 75% em 2003. Em 2002, três dos seis bairros apresentavam IPO acima de 40% e apenas um deles IPO = 87,5%. Esta proporção aumentou em 2003, e cinco dos seis bairros apresentaram IPO \geq 50% (Tabela 4).

Segundo informações geradas pela pesquisa larvária (SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMA DE FEBRE AMARELA E DENGUE, 2008) o IP para *A. aegypti* nos bairros do Recife variou de 0,67% a 9,24% em outubro/2001 e de 0 a 100% em abril/2002, sendo este último valor extremo registrado nos bairros de Afogados e Dois Irmãos (Tabela 3). Para *A. albopictus* as variações foram de 0 a 2,78% (2001) e 0 a 0,85% (2002). Nos bairros de Jaboatão dos Guararapes, em outubro de 2002, o maior valor de IP para *A. aegypti* foi 1,46% e para *A. albopictus* de 0,25%. Informações sobre o IP em 2003 não foram disponibilizadas SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMA DE FEBRE AMARELA E DENGUE, 2003).

Intensidade de infestação das áreas por Aedes spp. - No Recife, mais de 45.000 ovos de *Aedes* spp. foram coletados em 166 ovitrampas, durante duas semanas (Tabela 3), gerando uma média global de 135 ovos/armadilha/semana. A maioria deles (54,5%) foi coletada na estação de chuvas (abril). O número de bairros com densidade maior do que 100 ovos/ovitrampa aumentou de oito para 12, entre outubro/2001 e abril/2002 (Tabela 3). A densidade de ovos nos bairros do Recife foi quase sempre superior a 67 ovos/ovitrampa/semana na estação seca e, no período de chuvas, superior a 90 ovos/ovitrampa, (Tabela 3). Seis dos 10 bairros que apresentaram as densidades mais elevadas na estação seca permaneceram desta forma na estação de chuvas. O IDO duplicou em outros sete bairros na estação chuvosa (Tabela 3). A maioria destes bairros está localizada no subúrbio e têm em comum a presença de grandes conjuntos habitacionais, população de média a baixa renda, atividade comercial intensa, presença de cemitério, como em Casa Amarela e Santo Amaro, e, principalmente, proximidade a matas residuais, como nos bairros de Dois Unidos, Ibura e Dois Irmãos, (PERNAMBUCO DE A a Z, 2008).

As coletas de ovos realizadas em outubro de 2002 e de 2003 em Jaboatão dos Guararapes revelaram valores de IDO estatisticamente menores no 2º ano ($p > 0,000$), com

uma redução no valor global de 104 para 44 ovos/ovitrampa/semana (Tabela 4). Esta diminuição na densidade vetorial foi registrada em todos os bairros investigados. Nos dois anos consecutivos o maior IDO foi observado em Cavaleiro (226 e 107 ovos/ovitrampa/semana), bairro com imóveis de uso predominantemente comercial, e grande fluxo populacional. Em 2002, 35,7% das ovitrampas positivas coletaram menos de 50 ovos do mosquito/semana, este percentual subiu para 43,8% em 2003 (Figura 9).

A análise mostrou que na maioria das vezes não há correlação significativa entre o IPO e o IDO ou do IPO e do número médio de ovos, nos municípios estudados, exceto em Jaboatão dos Guararapes, em 2002 ($r = -0.9473$; $p = 0.004$) (Figura 10).

4.2.2.2 Abundância e frequência relativa de espécies de Aedes

As únicas espécies encontradas nas amostras provenientes das ovitrampas instaladas nos dois municípios foram *A. aegypti* e *A. albopictus*. *A. aegypti* correspondeu a aproximadamente 60% dos ovos coletados em Recife, nos dois momentos de avaliação, e em Jaboatão dos Guararapes em 2003. *A. albopictus* foi detectado em nove dos 18 bairros do Recife, sendo sua presença mais expressiva em Dois Irmãos e Dois Unidos, onde correspondeu a mais de 90% e 60% dos indivíduos identificados, respectivamente. Nas demais localidades, a frequência relativa desta espécie foi baixa, variando de 0,3% a 22,0% dos indivíduos identificados (Tabela 3).

Em Jaboatão dos Guararapes, a coexistência das espécies foi observada em todos os bairros e aproximadamente 30% das ovitrampas foram colonizadas simultaneamente por ambas. Neste município, *A. albopictus* foi a espécie predominante em 2002, 55,4% das 4.443 larvas identificadas (Tabela 4). No ano seguinte, a maior frequência (65,3%) foi de *A. aegypti*. A comparação entre as espécies nos locais estudados revelou que *A. albopictus* ocorreu com maior frequência e abundância nos bairros com cobertura vegetal abundante ($p = 0,024$) ao contrário de *A. aegypti* que esteve mais presente nas áreas com cobertura vegetal escassa (Tabela 4.). Em alguns bairros, como Cavaleiro e Marcos Freire, *A. aegypti* foi a espécie predominante tanto em 2002 quanto em 2003 (Tabela 4).

Ovos de *Psychoda* spp. (Diptera: Psychodidae), conhecido como mosca-de-banheiro, e de *Culex quinquefasciatus* foram eventualmente encontrados nas armadilhas, nos municípios estudados.

4.2.2.3 Viabilidade dos ovos coletados em campo

Do total de ovos coletado em Jabotão dos Guararapes aproximadamente 70% deles foram considerados viáveis nos dois anos de avaliação. Este percentual está composto principalmente por ovos íntegros trazidos para o laboratório, onde ocorreu a eclosão das larvas após a sua submersão em infusão de gramíneas. Em 2003 o percentual de eclosão (32,0%) das larvas ocorrido nas armadilhas, ainda em campo, foi significativamente maior ($p=0,001$) do que o de 2002 (14,1%).

Tabela 3. Níveis de infestação por *Aedes* spp. em bairros do município de Recife-PE, com base na pesquisa larvária e na coleta de ovos através de armadilhas de oviposição, instaladas em domicílios durante um ciclo de 5 a 7 dias, em outubro de 2001 (estação seca) e abril de 2002 (estação chuvosa).

Bairro	Índice de Infestação Predial (%) ¹				Nº de imóveis com ovitrampas (% positivos) ²		Total de ovos		IPO ³ (%)		IDO ⁴		Identificação das espécies ⁶ frequência (%)		
	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes Albopictus</i>		Out/	Abr/	Out/	Abr/	Out/	Abr/	Out/	Abr/	Nº larvas analisadas	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>
	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002			
	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002			
Sancho	2,94	-	0,37	-	10 (100)	10 (80,0)	2.401	3.366	85,0	85,0	141,2	139,5	207	100	0
Afogados	6,17	0	0,26	0	10 (100)	10 (100)	2.333	2.532	75,0	75,0	155,5	224,4	999	91,6	8,4
Encruzilhada	3,14	2,97	0	0,85	10 (80,0)	10 (90,0)	2.045	2.372	80,0	40,0	127,8	169,5	304	100	0
Torre	6,09	-	0,14	-	08 (75,0)	08 (90,0)	1.842	1.731	62,5	75,0	184,2	211,0	1.042	92,1	7,9
Boa Vista	2,49	1,04	0,08	0,12	08 (87,5)	08 (80,0)	1.675	1.633	68,7	37,5	152,2	133,5	413	100	0
Várzea ⁵	1,94	-	0,90	-	10 (100)	10 (70,0)	1.302	1.459	94,4	28,6	76,6	90,6	468	79,5	20,5
Campo Grande	0,67	2,81	0	0,21	10 (90,0)	10 (87,5)	1.082	1.443	80,0	55,0	67,6	132,6	NV	NV	NV
Ilha do Leite	5,00	-	0	-	08 (62,5)	08 (80,0)	1.032	1.390	56,3	50,0	114,7	166,7	930	90,2	9,8
Ilha do Retiro	9,24	-	0	-	08 (62,5)	08 (50,0)	893	1.356	43,8	65,2	127,6	144,3	165	100	0
San Martin	7,16	3,57	0,36	0	10 (77,8)	10 (62,5)	830	1.334	55,5	50,0	83,0	108,9	NV	NV	NV
Imbiribeira	-	0,37	-	0	10 (80,0)	10 (50,0)	828	1.266	75,0	75,0	55,2	158,2	634	99,7	0,3
Casa Amarela	2,13	-	0,79	-	10 (88,9)	10 (50,0)	747	1.054	61,1	40,0	67,9	131,7	131	100	0
Recife	4,61	-	0	-	06 (33,3)	06 (37,5)	729	801	33,3	31,3	182,3	94,0	228	100	0
Cordeiro	4,62	-	0,47	-	10 (87,5)	10 (70,0)	726	776	50,0	45,0	90,6	49,3	243	78,2	21,8
Dois Unidos ⁵	0,76	1,90	0,08	0,62	10 (100)	10 (80,0)	718	653	85,0	70,0	42,2	99,3	304	38,1	61,9
Ibura ⁵	5,93	0,94	0,54	0	10 (100)	10 (54,5)	695	544	80,0	70,0	43,4	123,6	705	94,3	5,7
Santo Amaro	3,37	1,57	0,31	0	08 (37,5)	08 (66,7)	401	470	31,2	50,0	80,2	158,2	NV	NV	NV
Dois Irmãos ⁵	6,71	100	2,78	0	10 (75,0)	10 (60,0)	275	444	56,3	70,0	30,5	99,3	227	06,6	93,4
Total					166 (63,2)	166 (57,0)	20.554	24.624	77,4	57,2	97,8	129,6	7.131	88,1	11,9

¹ Dados estimado pela pesquisa larvária; ² Percentual de imóveis com ovitrampas positivas; ³ IPO = Índice de Positividade de Ovitrampas; ⁴ IDO = Índice de Densidade de Ovos; NV: não verificado; ⁵ bairro com importante cobertura vegetal; ⁶ Análise relativa ao ano de 2002. – significa informação não disponibilizada; 0 = ausência da espécie de mosquito.

Fonte: Sistema de Informação do Programa de Controle da Febre Amarela e Dengue (2008), RECIFE, (2008).

Tabela 4. Níveis de infestação por *Aedes* spp. em bairros do município de Jaboatão dos Guararapes-PE, com base na pesquisa larvária e na coleta de ovos através de armadilhas de oviposição, instaladas em domicílios durante um ciclo de 5 a 7 dias, em outubro de 2002 e 2003.

Bairros	Índice de Infestação Predial (%) ¹ 2002		Nº de imóveis com ovitrampa (% positivos) ²		Total de ovos		IPO ³ (%)		IDO ⁴		Veg ⁵	Espécies Identificadas (%)					
												Nº larvas analisadas		<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes albopictus</i>	
	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003	
Sucupira	1,46	0,20	20 (75,0)	20 (75,0)	2.032	759	55,0	71,8	135,5	50,6	+++	1.076	182	22,0	27,0	78,0	73,0
Zumbi do Pacheco	0,57	0,21	08 (100)	08 (87,5)	1.668	637	87,5	75,0	233,5	91,0	+++	1.186	450	29,0	63,1	71,0	36,9
Cavaleiro	1,41	0,25	16 (43,7)	16 (87,5)	1.586	1.503	31,2	68,7	226,6	107,3	+	964	971	84,0	85,5	16,0	14,5
Muribeca	0,10	0	16 (31,2)	16 (25,0)	951	540	31,2	18,7	170,0	75,5	++	597	270	45,0	68,6	55,0	31,4
Engenho Velho	0,47	0,18	08 (75,0)	08 (75,0)	865	227	56,2	50,0	144,2	38,0	++	551	390	61,0	15,6	39,0	84,4
Marcos Freire	0	0	16 (25,0)	16 (68,7)	180	266	15,6	56,2	45,0	24,2	++	69	199	75,4	60,0	24,6	40,0
Total			84 (56,2)	84 (68,0)	7.282	3.932	42,2	53,2	104,0	44,2		4.443	2.233	44,6	65,3	55,4	34,7

¹ Dados estimado pela pesquisa larvária; ² Percentual de imóveis com ovitrampas positivas; ³ IPO = Índice de Positividade de Ovitampas; ⁴ IDO= Índice de Densidade de Ovos; ⁵ nível de cobertura vegetal : + escassa, ++ intermediária e +++ abundante.

Fonte: Sistema de Informação do Programa de Controle da Febre Amarela e Dengue, (2008), JABOATÃO DOS GUARARAPES, (2008).

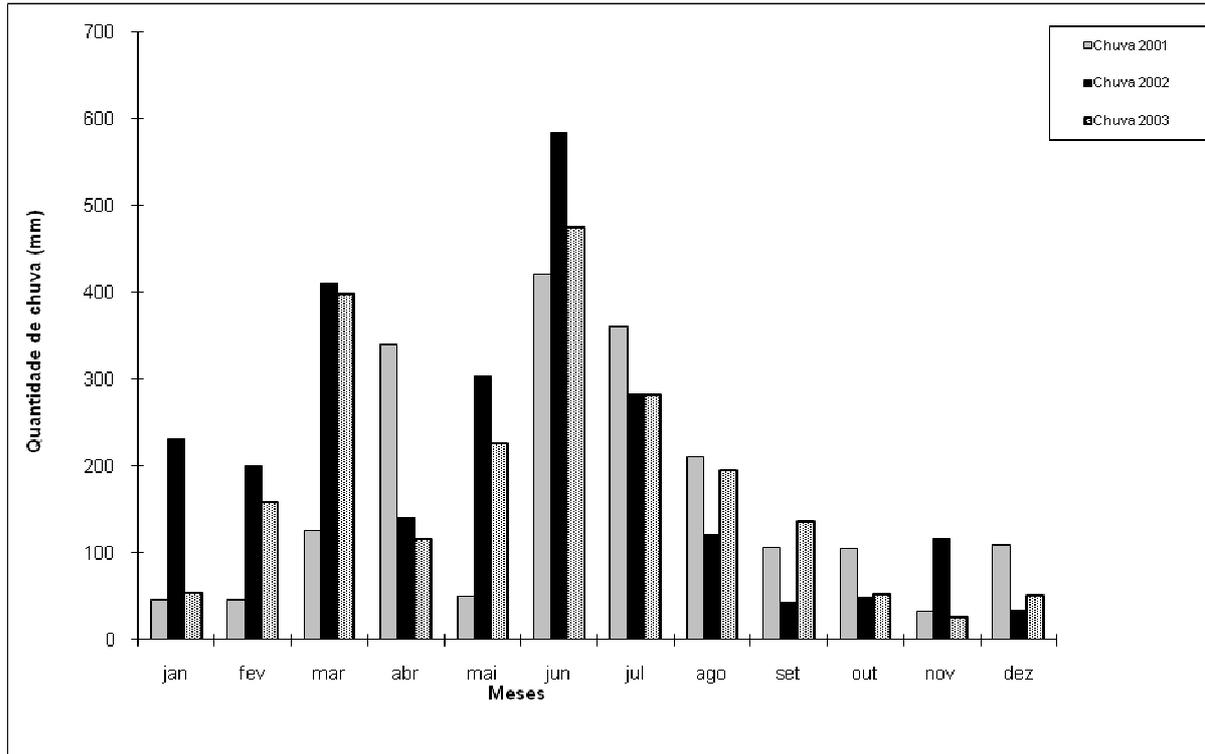


Figura 8- Precipitação mensal acumulada na Região Metropolitana do Recife, de 2001 a 2003. Dados coletados na Estação Meteorológica do Curado, Recife-PE. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (2008).

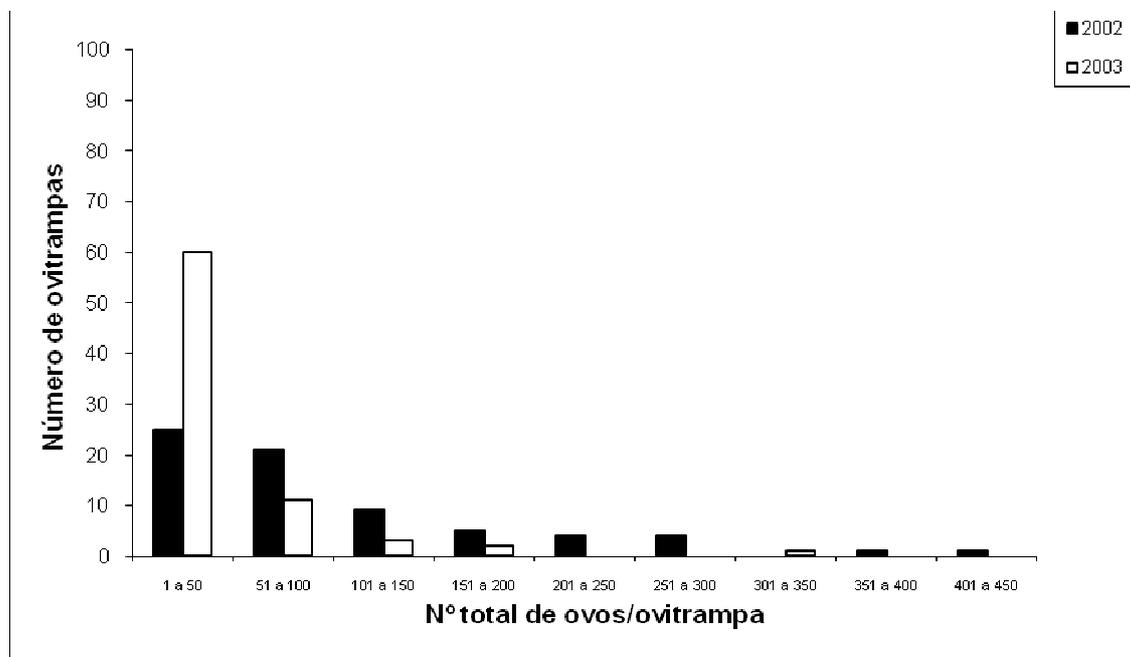


Figura 9. Distribuição das ovitrampas positivas em relação ao número de ovos de *Aedes* spp. coletados durante 5 a 7 dias do mês de outubro de 2002 e 2003, em bairros do município de Jaboatão dos Guararapes-PE.

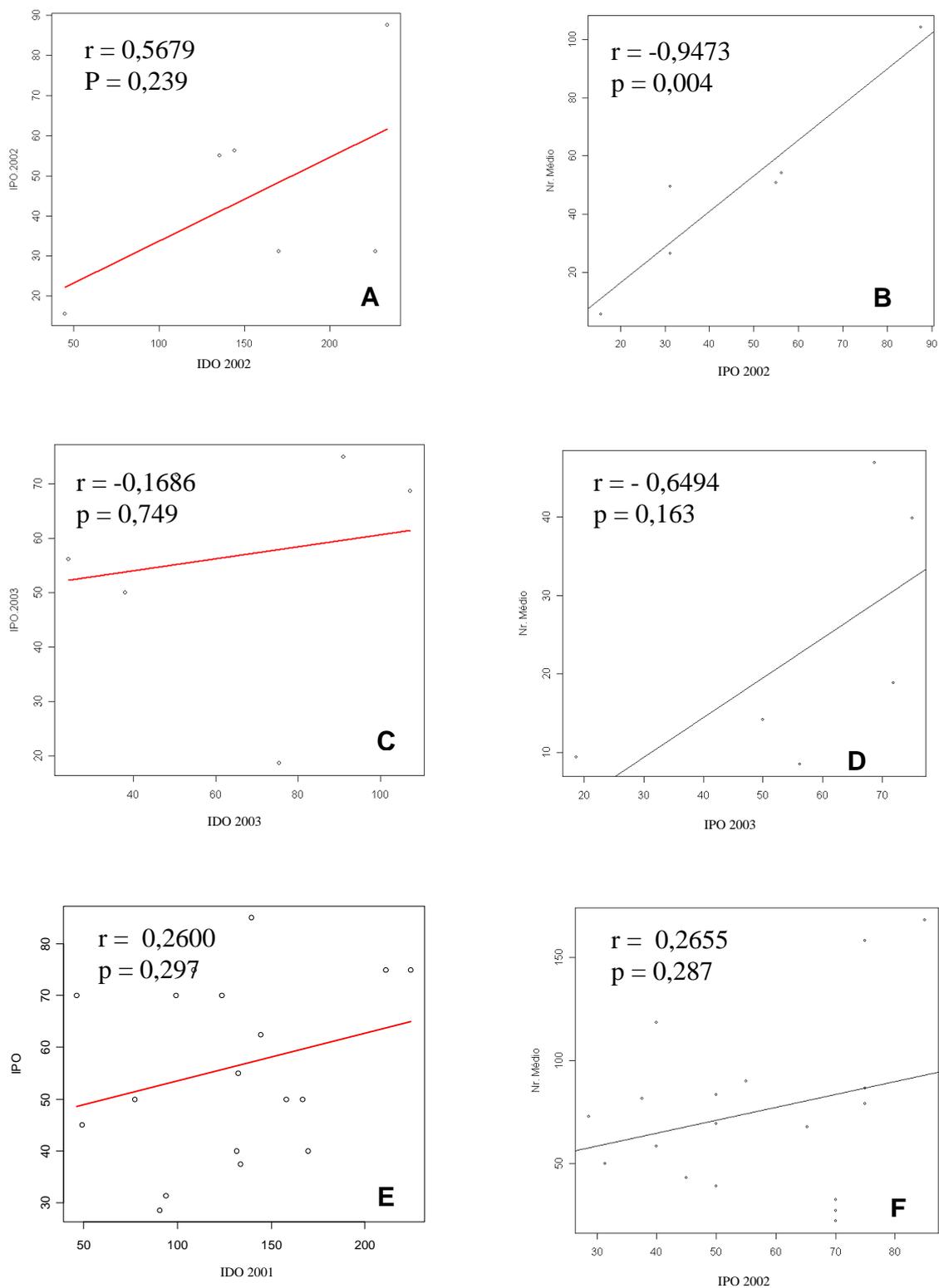


Figura 10 - Análise da correlação entre os índices de infestação para *Aedes* spp.: Positividade de Ovitrapas (IPO) x Densidade de Ovos (IDO) e IPO x número médio de ovos/ovitrampa, feita para os bairros dos municípios de Jabotão dos Guararapes (A, B, C, D) e Recife (E, F).

4.3 Estudo II: Distribuição espaço-temporal de *Aedes* spp. no bairro do Engenho do Meio, Recife-PE

4.3.1 Procedimentos Metodológicos

4.3.1.1 Área de estudo

Este estudo foi realizado no Engenho do Meio, um dos 94 bairros do Recife, localizado na zona oeste do município, com área de 0,89 km² e densidade de 11.865 hab/Km². Este bairro foi selecionado com base nos parâmetros descritos por Guimarães (1998) que o caracteriza como sendo de baixo risco para a transmissão de doenças veiculadas por vetores, como a dengue, e de média a elevada qualidade de vida, apesar da existência de pequenas favelas em áreas periféricas do bairro. Este espaço urbano apresenta baixa cobertura vegetal, representada, sobretudo por pequenas praças e terrenos baldios, está predominantemente ocupado por imóveis do tipo casa com quintal e jardim, e poucos prédios, com até três pavimentos. Dados da vigilância entomológica indicam que este bairro apresentava valores de IP para *A. aegypti* acima de 5,9% em 2001 e 2002 (SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMA DE CONTROLE DE FEBRE AMARELA E DENGUE, 2008).

4.3.1.2 Inquérito entomológico preliminar

Uma investigação preliminar foi realizada para conhecer o nível de infestação local, identificar as espécies de *Aedes* presentes e definir a área de avaliação. Para tanto, uma ovitrampa foi instalada em cada um dos 101 quarteirões existentes, por um período de sete dias. Em seguida, foram selecionados os quarteirões cujas armadilhas coletaram mais de 1.000 ovos, sorteado um deles e ampliada a área abrangendo os quatro quarteirões contíguos. Um total de 173 imóveis residenciais/casas compôs inicialmente a área de avaliação. Concomitante com a primeira instalação das ovitrampas foi realizada uma pesquisa larvária nos imóveis selecionados, para estimar o índice de infestação predial (IP). O estudo foi

realizado de outubro de 2001 a setembro de 2002. Dados de temperatura e precipitação para o período foram obtidos junto ao INMET.

4.3.1.3 Monitoramento da infestação da área

O modelo da ovitrampa utilizado foi similar ao descrito no item 1.1 (Figura 6A), entretanto, a metodologia diferiu do estudo anterior nos seguintes aspectos: as armadilhas receberam 500 ml de infusão de gramíneas, uma ovitrampa foi instalada em um ponto fixo de cada um dos 173 imóveis dos cinco quarteirões, permanecendo em campo durante os 12 meses de observação, pois o objetivo do estudo foi realizar uma análise longitudinal da infestação. Palhetas, infusão e biolarvicida (Bti) foram renovados a cada ciclo de 21 dias de permanência em campo.

4.3.1.4 Posicionamento geográfico das ovitampas

Neste trabalho a unidade básica de análise geográfica foi o lote (imóvel), sendo este a referência cartográfica para a localização das ovitampas. O mapa digital com a delimitação dos lotes e dos quarteirões foi construído no AutoCad a partir de um levantamento planimétrico da área de estudo. Com o propósito de analisar espacialmente os dados das ovitampas, o arquivo digital (.dwg) foi convertido para "Shape File" (.shp) e, posteriormente, importado pelo aplicativo geográfico TerraView, juntamente com informações sobre a contagem de ovos (RECIFE, 2008). Para a análise espacial foi realizada uma estratificação da quantidade de ovos coletados por cada ovitrampa/ciclo, considerando os seguintes intervalos: 0; 1 a 100; 101 a 300; 301 a 500; 501 a 1000 e 1001 a 5000 ovos.

4.3.1.5 Respostas de oviposição

Para estimar o tempo requerido para que a ovitrampa fosse reconhecida como sítio de oviposição no ambiente e definir a duração do ciclo de coleta de ovos, as palhetas foram

coletadas semanalmente nas três primeiras semanas do estudo (de 17 de outubro a 08 de novembro de 2001).

4.3.1.6 Dados epidemiológicos

Informações sobre os casos notificados de dengue em moradores do bairro de Engenho do Meio em 2002 foram obtidas do SINAN.

4.3.1.7 Análises estatísticas

Para a análise dos dados foram adotados os seguintes critérios de exclusão para a amostra: -a) imóveis cujos proprietários se recusaram a participar do estudo em seu início ou em qualquer outro momento e -b) imóveis sem informações da ovitrampa por mais de três ciclos. O cálculo para estimar a flutuação populacional considerou o número médio de ovos/ovitrampa/ciclo. Os resultados foram apresentados através de tabelas ou gráficos, a partir do cálculo de medidas descritivas como: média, número mínimo/máximo e desvio padrão. Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo aplicou-se o teste de Shapiro Wilk. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado o teste Kruskal Wallis, quando comparados mais de dois grupos, em se tratando de um fator, e o teste Mann Wiltney, quando encontrada significância no resultado do Kruskal Wallis. Para a análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste Qui-quadrado de proporção e de tendência. As conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ou 1%. Os programas utilizados foram o Excel 2000, R 2.6.0 e o TerraView.

4.3.2 Resultados

Dos 173 imóveis selecionados, 46 foram eliminados de acordo com os critérios de exclusão. A pesquisa larvária realizada no momento de instalação das ovitrampas demonstrou

que 2,3% dos 127 imóveis investigados estavam positivos para larvas/pupas do mosquito, enquanto os dados das ovitrampas indicaram que *A. aegypti* esteve presente em 80,3% dos imóveis. Apesar dos índices larvários apontarem a ocorrência exclusiva de *A. aegypti* no bairro, a análise de uma amostra de 2.001 ovos coletados nas ovitrampas mostrou que 5,4% deles era de *A. albopictus*.

O Qui-quadrado de proporções e tendência mostrou que a positividade das ovitrampas aumentou significativamente ($p=0,0001$) ao longo das três semanas iniciais de coleta, passando de 47,0% para 76,6%, atingindo 81,8% na última semana. A comparação entre os percentuais, por outro lado, apontou que a diferença só foi estatisticamente significativa ($p=0,0001$) entre a primeira e a segunda semana. Este resultado, associado a questões de cunho operacional relativas aos momentos de troca das palhetas em campo, foi suficiente para definir que o ciclo de coleta deveria ter duração de 21 dias.

Um total de 337.302 ovos foi coletado em 1.850 palhetas, recolhidas em 15 ciclos, no período de um ano (outubro/01 a setembro/02). Uma perda acumulada de menos de 3% das informações oriundas das ovitrampas foi registrada no curso do estudo (Tabela 5). Na Figura 11 é possível observar que a maioria das ovitrampas coletou de um até 300 ovos por ciclo.

Cada um dos imóveis investigados esteve positivo para ovos de *Aedes* spp. em pelo menos sete dos 15 ciclos de observação. Os bairros 64, 65 e 69 diferiram estatisticamente ($p<0,0001$) entre si quanto à intensidade da infestação, e o 65, 66 e 67 apresentaram intensidades similares (Figura 12). Apesar disto, o padrão de flutuação temporal da população do mosquito foi semelhante nos cinco bairros, com pico de densidade de ovos ocorrendo no 5º ciclo (Jan/2002), seguido de uma redução progressiva e significativa ($p=0,0001$) do número médio de ovos/ovitrampa do 9º ao 15º ciclos, com declínios mais acentuados no 9º (abr-mai), 10º (maio-junho) e 11º ciclos (junho-julho), exceto para este último ciclo nos bairros 64 e 67 (Tabela 5; Figuras 13,15 e 17).

A distribuição espaço-temporal da infestação está representada nas figuras 14 a 18. Ao longo do estudo, 106 imóveis estiveram negativos para *Aedes* spp., 40,6% dos quais, em apenas um ciclo, 21,0% em dois ciclos, 16,0% em três, 13,2% em quatro ou cinco ciclos e 9,4% se apresentaram negativos em 6 a 9 ciclos. Em alguns bairros, como o 65 e o 66, mais de 75,0% dos imóveis estiveram negativos em pelo menos um dos 15 ciclos de coleta de ovos. O percentual de imóveis com ovitrampas negativas variou de 1,6% a 15,0% nos oito

ciclos que ocorreram até meados de abril e de 9,7% a 40,0% nos sete ciclos restantes (Figura 14-18). Concomitantemente, neste último período foi observada uma redução significativa ($p=0,001$) da densidade de ovos em todos os quarteirões. A análise espacial dos dados mostrou que os imóveis negativos estão distribuídos aleatoriamente na área de estudo. Em algumas ocasiões, observam-se imóveis negativos contíguos a imóveis com elevada densidade do mosquito (Figura 14, 15, 16, 17 e 18). Por outro lado, 50 dos 127 imóveis estiveram positivos em 14 dos 15 ciclos de coleta e juntos corresponderam a 202.281 ovos, ou seja, 60,0% do total coletado. Em 31 destes 50 imóveis, as ovitrampas recolheram mais de 250 ovos no 1º ciclo de monitoramento e, na maioria dos casos, um total superior a 4.300 ovos/imóvel, durante a avaliação de 15 ciclos.

Uma tendência à agregação foi observada entre os imóveis mais infestados, visto que 62% deles situavam-se em apenas dois dos cinco quarteirões, o Qt 64 (38%) e o Qt 65 (24%). Apesar das variações entre os quarteirões, a área permaneceu amplamente infestada desde outubro de 2001 até abril de 2002, como revelam os índices inferidos para o período (Tabela 5).

A variação pluviométrica na área ao longo do estudo e nos anos imediatamente anterior e posterior mostra que nos meses de janeiro e fevereiro de 2002 choveu bem mais do que nos mesmos meses dos outros anos (Figura 8). O primeiro grande pico de chuvas foi registrado em março (409,0 mm), depois um declínio bem marcado em abril (140,2 mm), seguido de um aumento progressivo até o segundo pico em junho (583,5 mm). Ao observar o comportamento de distribuição das chuvas é possível perceber que estas se tornam mais frequentes de janeiro a julho de cada ano, podendo este padrão variar bastante ano a ano, nos meses de janeiro e fevereiro. A temperatura média oscilou de 26,0 a 27,4 °C.

Em 2002 foram notificados, no bairro do Engenho do Meio, 151 casos de dengue, dos quais 144 (95,4%) ocorreram de janeiro a março, mesmo período em que foi registrada a maior densidade vetorial na área, com média de 336,5 ovos/ovitrampa/ciclo. Nos períodos subsequentes observou-se uma redução brusca e significativa ($p=0,0001$) tanto do número de casos quanto da densidade de vetores (Figura 19).

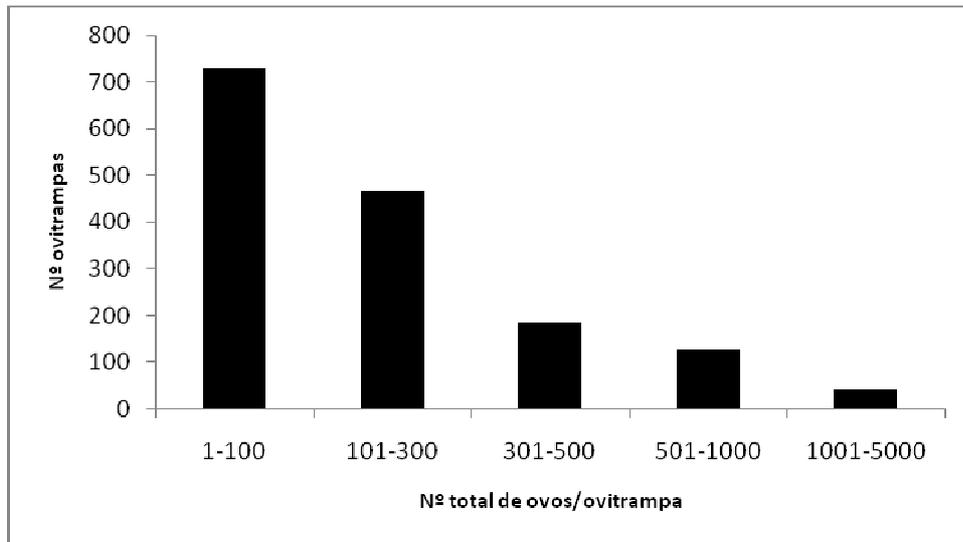


Figura 11– Frequência de ovitrampas positivas para ovos de *Aedes* spp. no bairro de Engenho do Meio, no período outubro de 2001 a setembro de 2002.

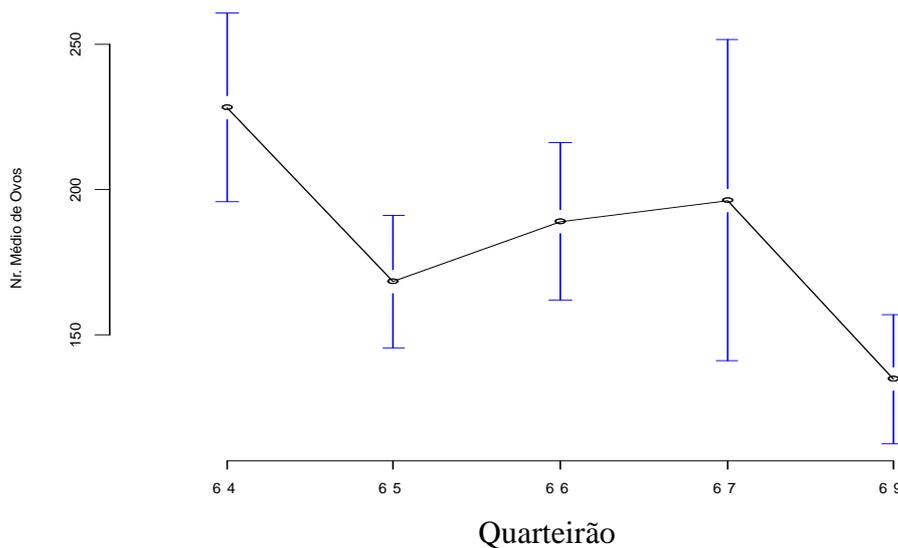


Figura 12 – Comparação entre os níveis de infestação por *Aedes* spp. de cinco quarteirões localizados no bairro do Engenho do Meio, Recife-PE, no período de outubro de 2001 a setembro de 2002.

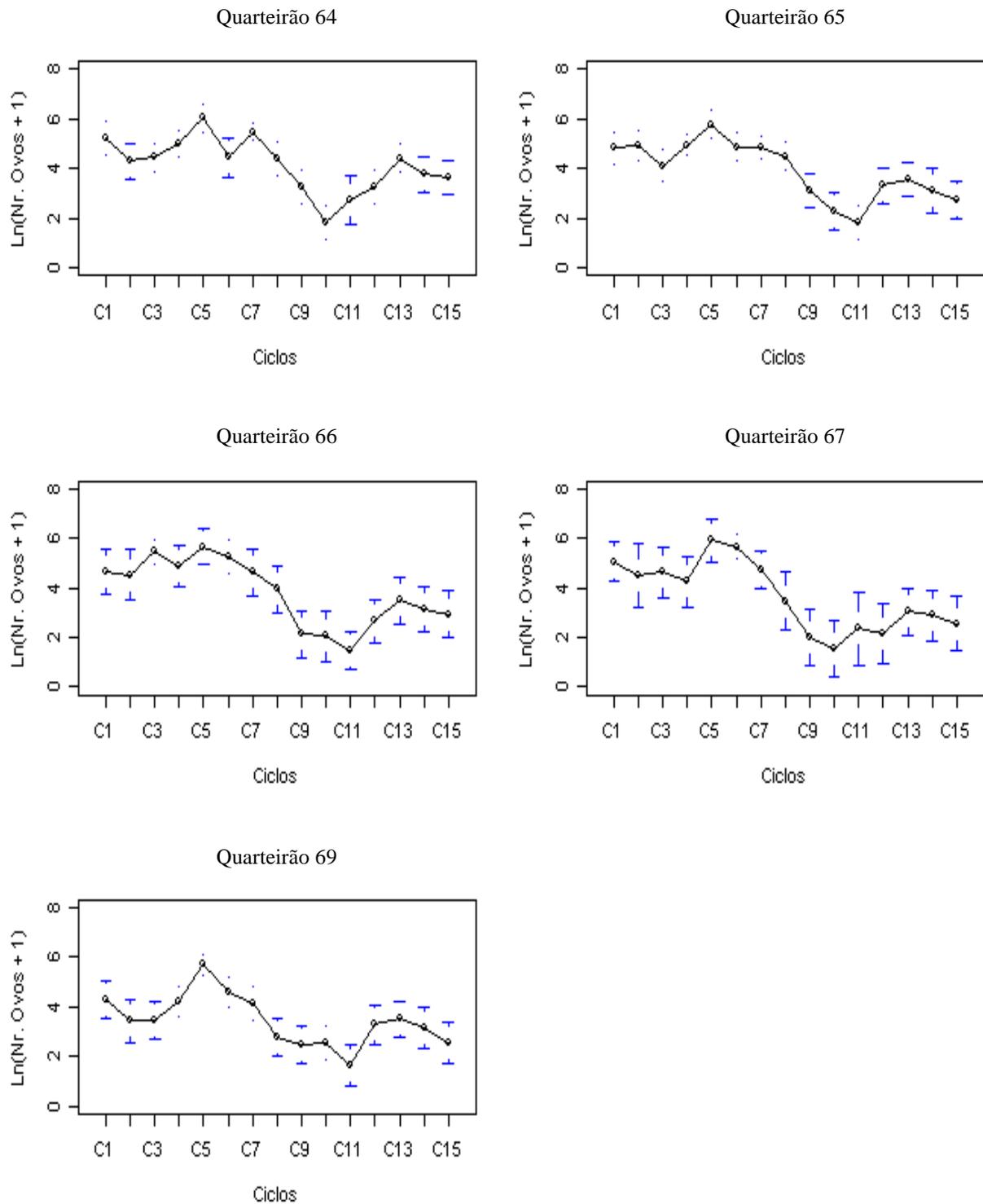


Figura 13 – Flutuação temporal da densidade de ovos de *Aedes* spp. registrada por ovitrampas instaladas em 127 imóveis, distribuídos em cinco quarteirões (64-69) do bairro do Engenho do Meio, Recife-PE, registrada ao longo de 15 ciclos de coleta (C1-C15) com duração de 21 dias, no período de outubro de 2001 a setembro de 2002.

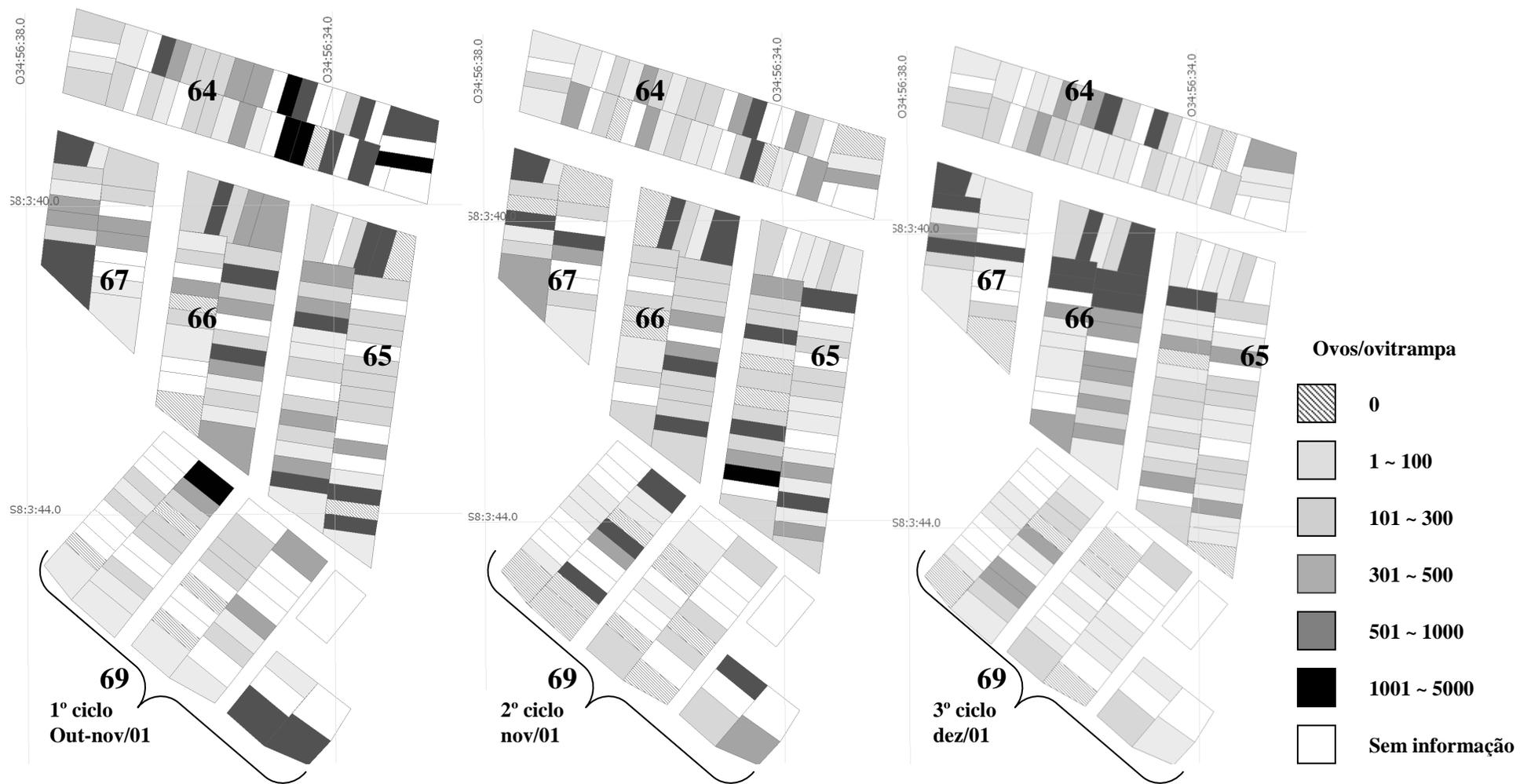


Figura 14 – Distribuição espacial da infestação por *Aedes* spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrampas ao longo de três ciclos de coleta (1º-3º) com duração de 21 dias, no período de outubro a dezembro de 2001.

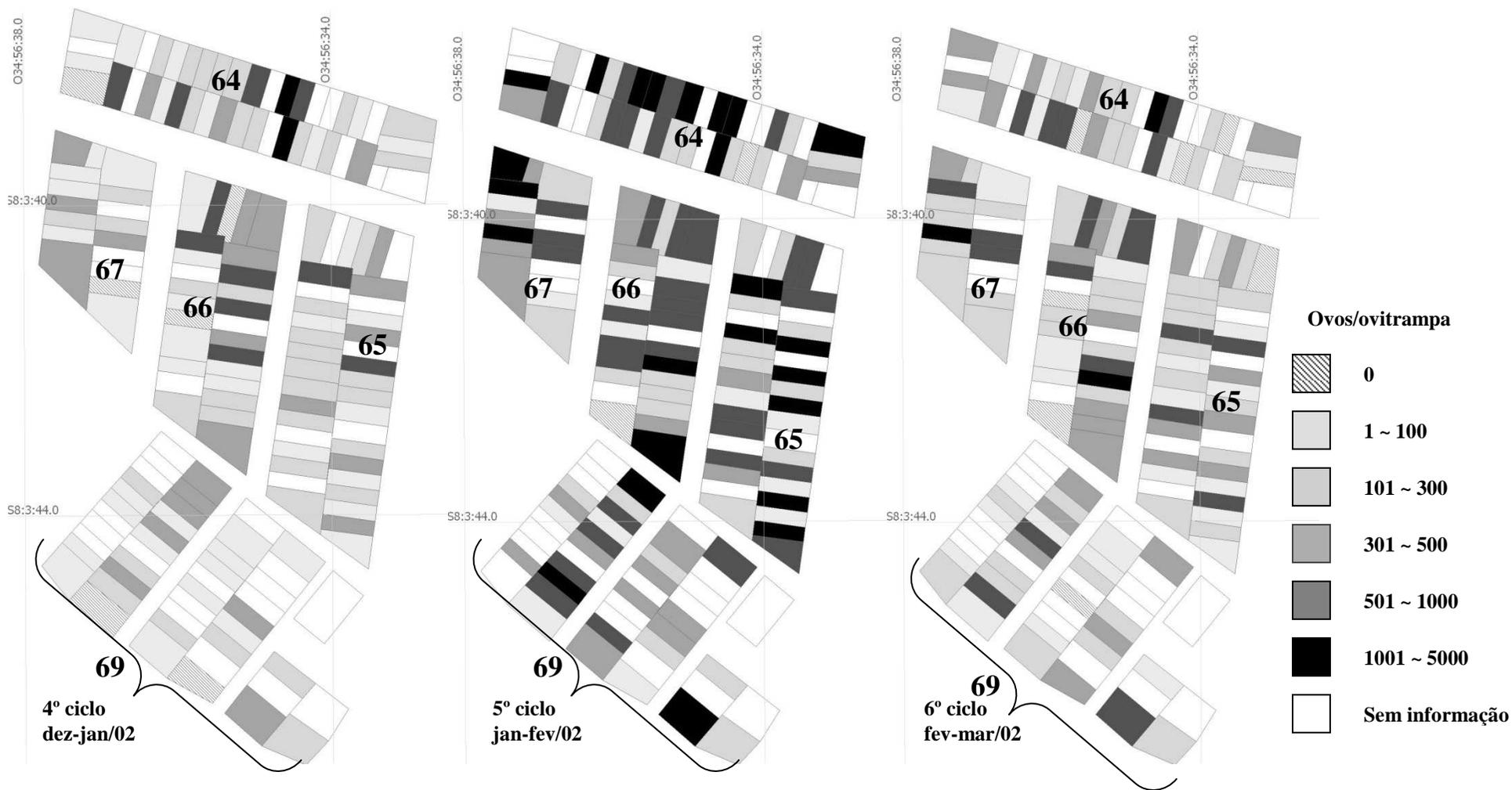


Figura 15 – Distribuição espacial da infestação por *Aedes* spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrampas ao longo de três ciclos de coleta (4º-6º) com duração de 21 dias, no período de dezembro/01 a março/2002.

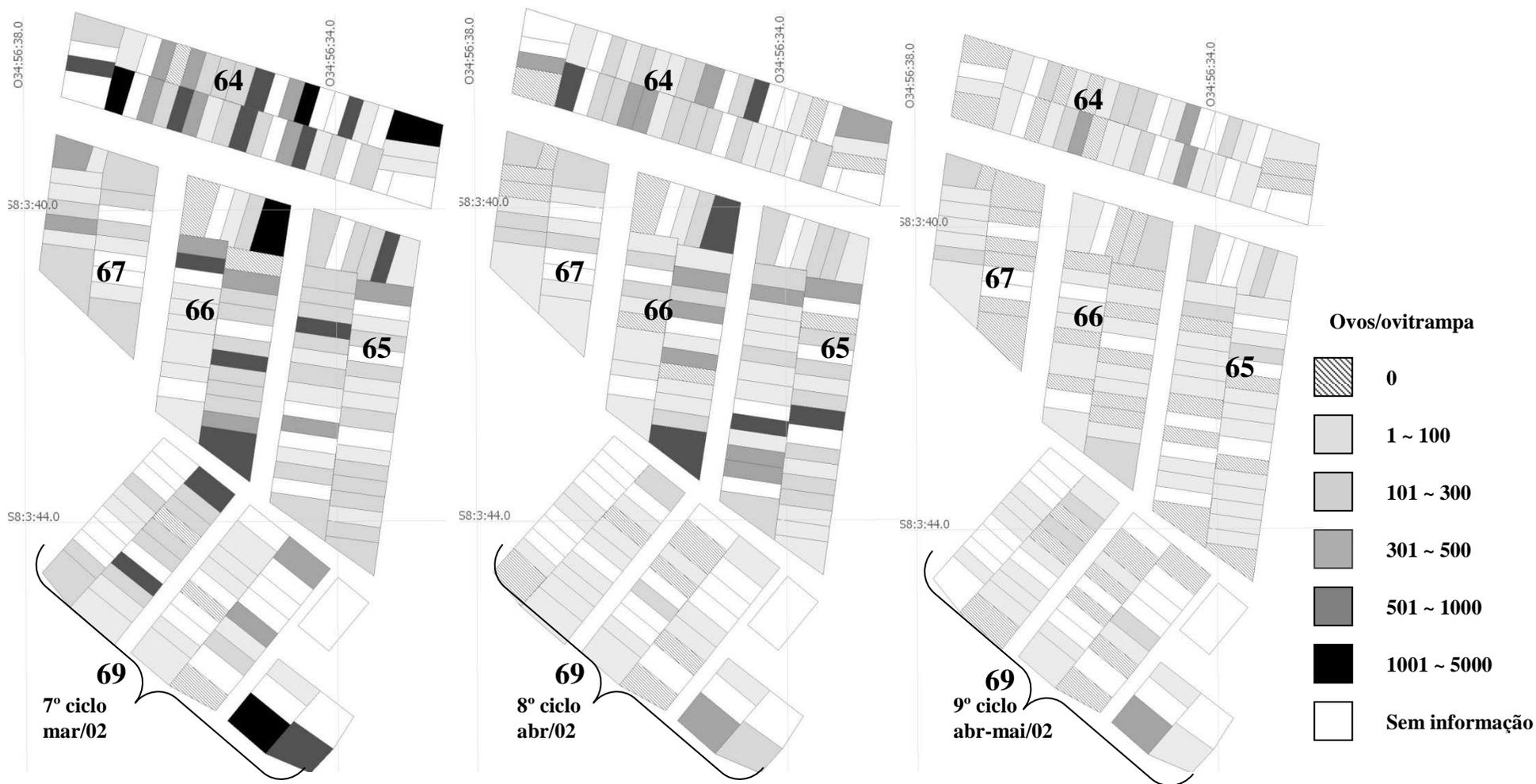


Figura 16 – Distribuição espacial da infestação por *Aedes* spp. em 127 imóveis localizados em cinco bairros (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrampas ao longo de três ciclos de coleta (7º-9º) com duração de 21 dias, no período de março a maio de 2002.

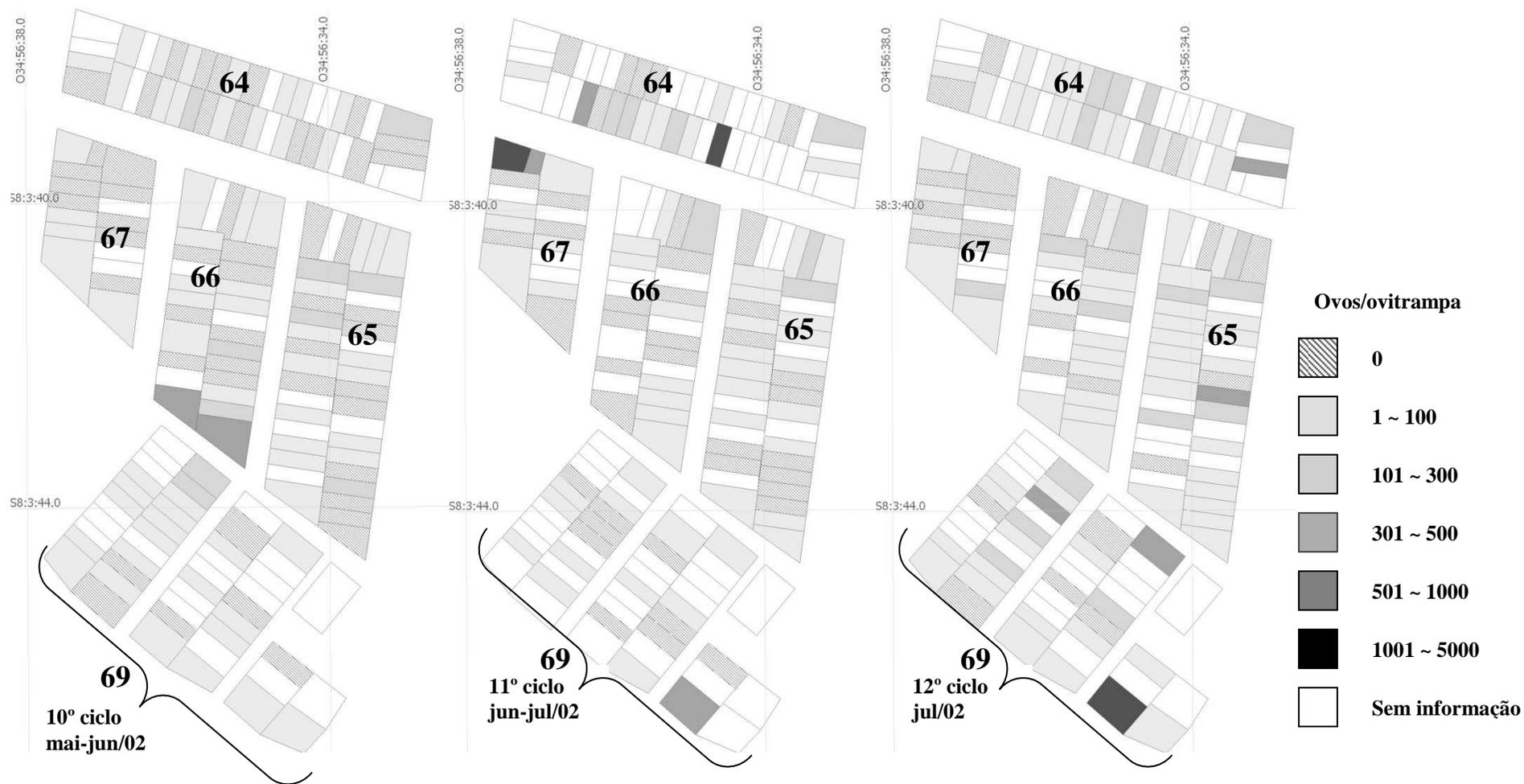


Figura 17 – Distribuição espacial da infestação por *Aedes* spp. em 127 imóveis localizados em cinco bairros (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrampas ao longo de três ciclos de coleta (10º-12º) com duração de 21 dias, no período de maio a julho de 2002.

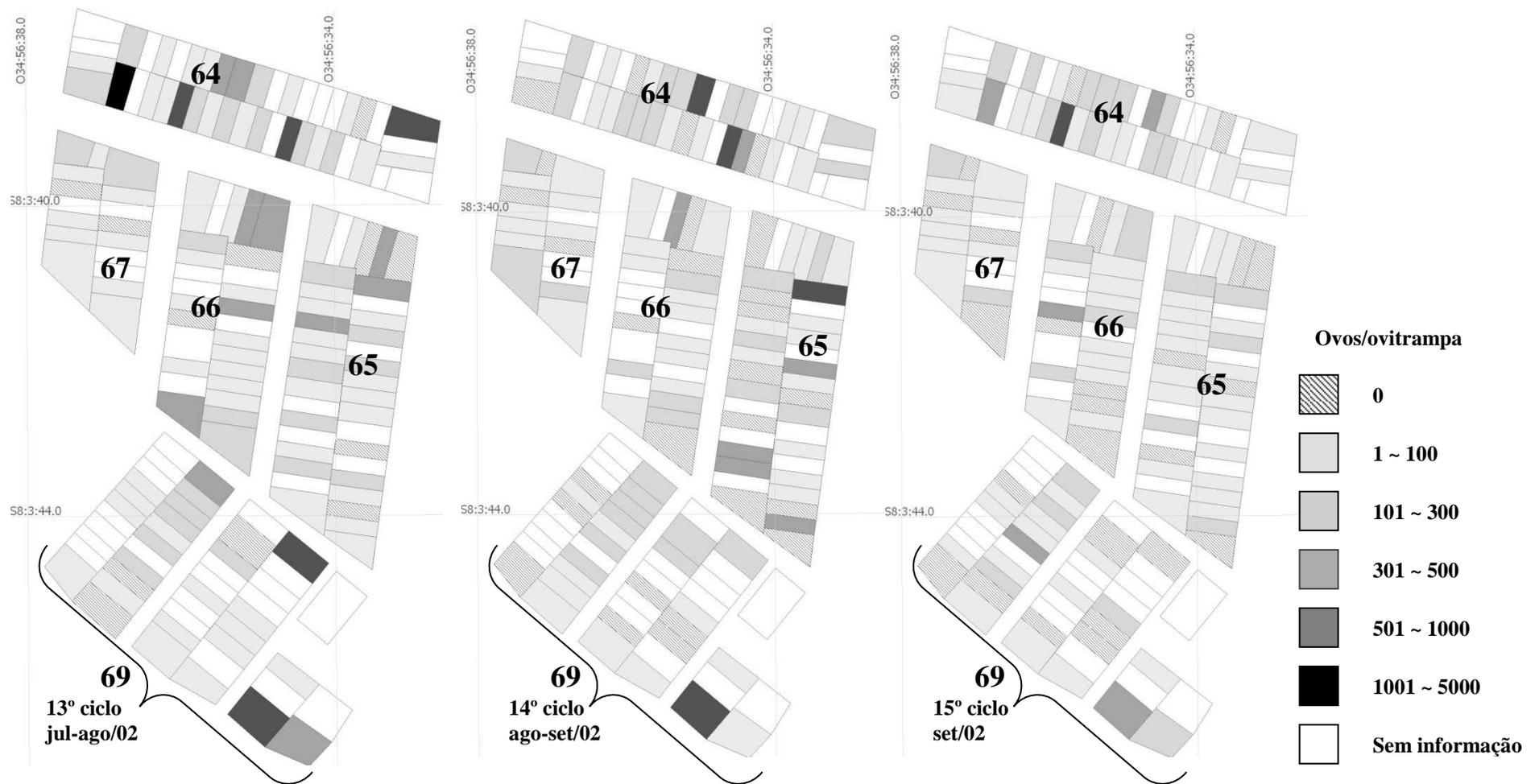


Figura 18 – Distribuição espacial da infestação por *Aedes* spp. em 127 imóveis localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, verificada através de ovitrampas ao longo de três ciclos de coleta (13º-15º) com duração de 21 dias, no período de julho a setembro de 2002.

Tabela 5 – Índices de infestação por *Aedes* spp. estimados a partir da coleta por ovitrampas em 127 imóveis, localizados em cinco quarteirões (64-69) do bairro de Engenho do Meio, Recife-PE, ao longo de 15 ciclos de coleta (C1-C5) com duração de 21 dias, no período de outubro de 2001 a setembro de 2002.

Parâmetros	Ciclos de coleta de ovos														
	1º (out/nov)	2º (nov)	3º (dez)	4º (dez/jan)	5º (jan/fev)	6º (fev/mar)	7º (mar)	8º (abr)	9º (abr/mai)	10º (mai/jun)	11º (jun)	12º (jul)	13º (jul/ago)	14º (ago/set)	15º (set)
Quarteirão-64															
Nº ovitrampas	31	31	31	31	30	31	30	30	31	31	21	30	31	31	28
Total ovos	14.610	6.464	5.710	8.906	24.945	8.037	10.563	5.290	2.567	798	1.778	2.049	6.298	4.321	3.409
Nº médio ovos/ovitrampa	456,6	202,0	178,438	278,3	804,7	251,2	340,742	170,6	80,2	24,9	80,8	66,097	196,8	135,0	117,6
Desvio Padrão	508,1	198,7	165,901	306,4	770,7	271,5	294,405	142,8	100,3	37,9	139,565	78,2	300,8	170,6	171,1
IPO	93,7%	87,5%	93,7%	96,9%	96,8%	84,4%	100%	90,3%	84,4%	68,8%	68,2%	87,1%	96,9%	84,4%	93,3%
Quarteirão-65															
Nº ovitrampas	27	27	27	26	26	27	27	27	26	27	26	26	27	27	27
Total ovos	7.790	7.925	4.058	5.770	15.513	6.906	5.792	4.865	1.448	1.044	639	1.959	2.833	3.632	1.754
Nº médio ovos/ovitrampa	268,6	273,3	144,9	213,7	574,6	238,1	199,724	167,759	51,7	36	22,8	69,9	97,7	125,2	60,5
Desvio Padrão	247,3	281,9	154,5	204,4	494,2	209,6	171,9	154,7	51,5	46,9	37,8	80,5	112,7	194,1	89,5
IPO	93,1%	96,5%	93,0%	100%	100%	96,5%	100%	100%	78,6%	58,6%	64,3%	86,0%	86,2%	69,0%	79,3%
Quarteirão-66															
Nº ovitrampas	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	18	21	20	19	20
Total ovos	5.199	5.143	7.210	6.073	10.301	6.803	5.310	3.602	840	1.401	259	956	2.508	1.327	1.300
Nº médio ovos/ovitrampa	247,6	244,9	343,3	289,2	490,5	324,0	252,9	171,5	40,0	66,7	14,4	45,5	125,4	69,8	65,0
Desvio Padrão	226,5	225,5	235,3	268,6	362,2	267,8	257,8	212,7	71,9	140,8	33,9	69,5	160,8	101,6	89,7
IPO	90,4%	85,7%	100%	90,5%	95,2%	95,2%	90,5%	85,7%	57,1%	57,1%	55,6%	76,2%	90,0%	79,0%	80,0%
Quarteirão-67															
Nº ovitrampas	15	15	15	15	15	15	15	14	15	15	13	15	14	15	14
Total ovos	4.029	4.032	4.139	2.545	12.507	6.699	3.425	1.215	487	354	1.333	551	615	717	544
Nº médio ovos/ovitrampa	268,6	268,8	275,9	169,7	833,8	446,6	228,3	86,8	32,5	23,6	102,5	36,7	43,9	47,8	38,9
Desvio Padrão	198,2	224,6	311,1	163,0	1150,7	533,9	344,6	88,6	49,7	38,0	216,0	47,1	45,9	58,7	51,2
IPO	100%	86,7%	93,3%	93,3%	100%	100%	100%	78,6%	53,3%	60,0%	61,3%	53,3%	85,7%	80,0%	71,4%
Quarteirão-69															
Nº ovitrampas	29	29	29	28	28	29	29	27	28	29	22	27	29	29	27
Total ovos	7.315	4.272	3.023	4.341	12.973	6.002	4.827	1.480	1.351	1.275	628	2.764	3.391	2.723	1.840
Nº médio ovos/ovitrampa	243,8	142,4	100,8	149,7	447,3	200,1	160,9	52,9	46,6	42,5	27,3	98,7	116,9	93,9	65,7
Desvio Padrão	499,3	200,3	115,6	156,6	382,6	180,0	225,2	84,7	80,4	67,6	66,1	166,2	176,0	135,3	106,3
IPO	86,7%	73,3%	80,0%	93,1%	100%	96,7%	90,0%	75,8%	65,5%	80,0%	56,5%	78,6%	86,2%	72,4%	67,8%
Area total															
Nº ovitrampas	127	127	126	124	123	127	126	123	125	127	104	123	124	124	120
Total ovos	38.943	27.836	24.140	27.635	76.239	34.447	29.917	16.452	6.693	4.872	4.637	8.279	15.645	12.720	8.847
Nº médio ovos/ovitrampa	306,6	219,2	191,6	222,9	619,8	271,2	237,4	133,8	53,5	38,4	44,6	67,3	126,2	102,6	73,7
Desvio Padrão	393,4	229,9	205	236,6	655,7	290	259,9	151,5	77,1	73,6	109,4	102,6	198,1	151,4	116,6
IPO	92,1%	85,8%	91,3%	95,2%	98,4%	93,7%	96,0%	86,2%	70,4%	59,8%	61,5%	78,9%	89,5%	76,6%	78,3%
Perda de informação (%)	0	0	0,8%	2,4%	3,1%	0	0,8%	2,4%	1,6%	0	18,1%	3,1%	2,4%	2,4%	4,7%

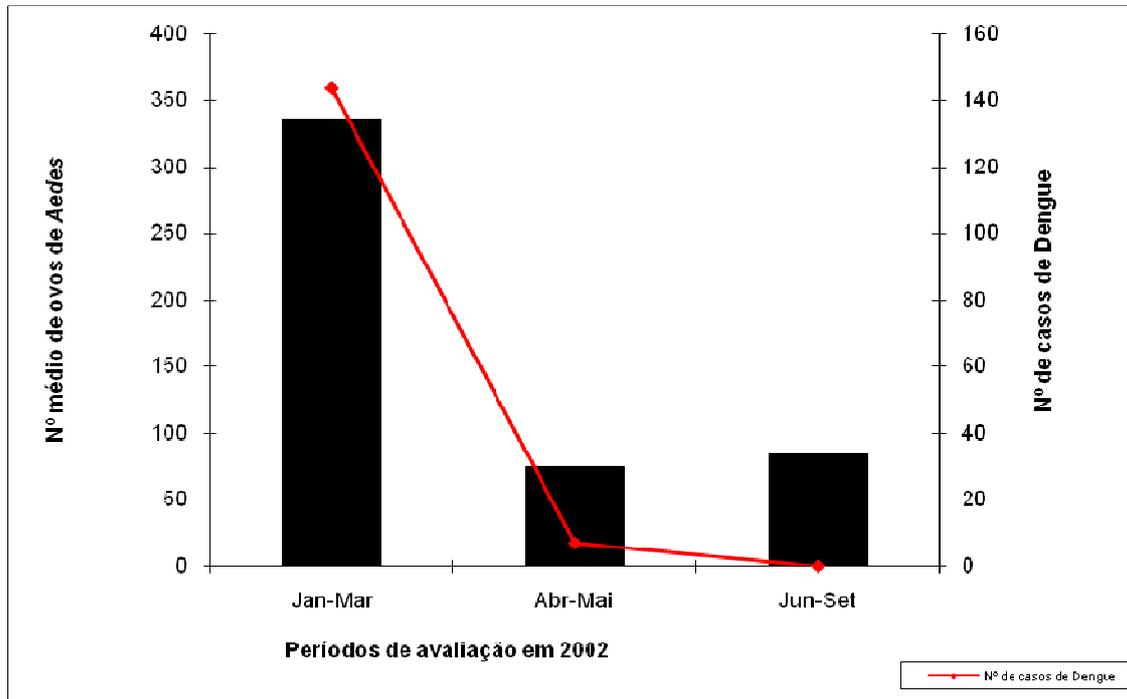


Figura 19 - Casos de dengue em habitantes do Engenho do Meio, notificados no período de janeiro a setembro de 2002 e densidade de ovos de *Aedes* spp. no mesmo período.

Fonte: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco/Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2007.

4.4 Discussão

Os índices de infestação estimados pela presença e quantidade de ovos coletados indicaram uma ampla distribuição de *A. aegypti* e *A. albopictus* nos 18 bairros do Recife e 6 de Jaboatão dos Guararapes, de 2001 a 2003. Os índices de positividade das armadilhas indicaram maior disseminação da infestação nos bairros do Recife do que em Jaboatão. Na epidemia de 2002 a incidência da doença foi bem maior em Recife (2.502 casos/100.000 hab.) do que em Jaboatão dos Guararapes (1.505 casos/100.000 hab.) (CORDEIRO, 2008). Esta epidemia, associada ao DENV3, foi considerada o evento de maior magnitude em Pernambuco e no país, com registros de cerca de 112.000 e 800.000 casos da doença, respectivamente (BRAGA; VALLE, 2007a; CORDEIRO, 2008; MONTENEGRO *et al.*, 2006).

A análise de dados epidemiológicos e entomológicos do bairro Engenho do Meio, em Recife, revelou, de fato, uma clara superposição entre a elevada densidade populacional do vetor e o período de maior registro de casos da doença, seguida de expressiva redução dos dois parâmetros a partir de abril de 2002 (9º ciclo de coleta de ovos). Segundo informações da Secretaria Municipal de Saúde, além do mutirão de limpeza realizado no bairro em março/2002, houve uma importante mudança nas ações de controle em maio daquele ano, com a substituição do temefós por larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), após detecção da resistência àquele inseticida organofosforado na população local de *A. aegypti*. Ainda que nosso estudo não tenha pretendido mensurar o impacto das ações de controle sobre a população alvo, visto que não foram obtidas informações sobre os índices em uma área sem intervenções de controle, nossos dados registraram uma redução populacional acentuada após a implementação destas ações no bairro.

Diversos trabalhos referem que em períodos epidêmicos a forte mobilização dos setores públicos responsáveis pelo controle da dengue, e da própria população motivada pela divulgação de casos, pode levar a uma redução do número de criadouros reais e potenciais do *A. aegypti*. Contudo, as práticas/cuidados que garantiriam sustentabilidade do controle pela eliminação dos criadouros no ambiente domiciliar costumam ser abandonadas à medida que se percebe a redução da intensidade de transmissão da doença (LENZI; COURA, 2004; SABROZA; TOLEDO; OSANAI, 1992).

Em relação à distribuição espacial das espécies, os resultados indicaram predominância de *A. aegypti* em Recife em 2001 e 2002 e em Jaboatão dos Guararapes em 2003. A ocorrência e abundância relativa de *A. albopictus* nos dois municípios foi maior nos bairros com maior cobertura vegetal, principalmente Dois Irmãos e Sucupira. Coincidentemente, os primeiros registros da presença de *A. albopictus* foram nestes mesmos bairros, através da pesquisa larvária, na década de 1980. Investigações subseqüentes utilizando ovitrampas referem a ocorrência desta espécie em diversos bairros dos municípios citados e destacam sua predominância, em áreas silvestres e urbanas do bairro de Dois Irmãos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2000; REGIS *et al.*, 2008). Estes autores acreditam que as condições ambientais encontradas nesta área favoreçam a manutenção de *A. albopictus* e sugerem que este bairro seria um dos pontos de dispersão da

espécie para outros espaços urbanos do Recife. A associação entre *A. albopictus* e densa cobertura vegetal em áreas urbanas, suburbanas e rurais tem sido referida no Brasil e em outros países (HAWLEY, 1988; LIMA-CAMARA *et al.*, 2006; NAKAZAWA, 2006; SANTOS *et al.*, 2003; RÍOS-VELAQUEZ *et al.*, 2007).

Embora ovos de *Aedes* spp tenham sido coletados nas ovitrampas instaladas no Recife nos dois períodos estudados, a maior densidade foi observada na estação chuvosa (abril), quando a taxa de positividade das armadilhas foi inesperadamente menor do que a da estação seca (outubro). Observações similares relatadas em estudos sobre variações sazonais de densidades de *A. aegypti*, sugerem que o número reduzido de criadouros disponíveis no ambiente durante a estação seca pode potencializar a competitividade e eficiência da armadilha (MICIELI; CAMPOS, 2003; MOGI *et al.*, 1988). É importante ressaltar que no estudo I as ovitrampas permaneceram em campo por no máximo sete dias, e que o fator tempo de permanência em campo é certamente decisivo para revelar a verdadeira infestação de uma área, como foi observado em nosso estudo no bairro do Engenho do Meio. Outras experiências, baseadas no uso contínuo desta ferramenta não apontam a diminuição do percentual de positividade de ovitrampas na estação mais chuvosa (REGIS *et al.*, 2008).

A sazonalidade do crescimento populacional de *Aedes* spp. no Brasil tem levado ao reconhecimento de dois padrões. O primeiro cujo aumento populacional ocorre durante o verão, quando as chuvas são intensas e esparsas, e as temperaturas são elevadas (GLASSER; GOMES, 2002; RÍOS-VELASQUES *et al.*, 2006; SERPA *et al.*, 2006; SOUZA-SANTOS, 1999) e o segundo na estação de chuvas propriamente dita, em regiões onde não se registram quedas significativas de temperatura durante o inverno (PINHEIRO; TADEI, 2002; RÍOS-VELÁSQUEZ *et al.*, 2007). Os dados coletados no Recife neste estudo parecem concordar com o segundo padrão, visto que a densidade de ovos observada em abril/2002 (estação de chuvas) foi estatisticamente maior do que a de outubro/2001 (estação seca). Alguns autores têm chamado a atenção para a importância do período de transição entre as estações e seu papel na manutenção e aumento inicial do crescimento populacional, sobretudo em áreas onde os criadouros mais frequentes são reservatórios domésticos do tipo tonel, tanque, caixa d'água e outros, quase

sempre presentes no ambiente domiciliar (FORATTINI; BRITO, 2003; REGIS *et al.*, 2008; RÍOS-VELÁSQUEZ *et al.*, 2007).

A elevada viabilidade dos ovos de *Aedes* spp., observada em nosso estudo é similar àquela descrita para populações de *A. albopictus* do Recife e de *A. aegypti* da Paraíba (BESERRA, *et al.*, 2006; MONTEIRO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2007). Beserra *et al.* (2006) concluíram que em situações ambientais onde a temperatura oscila de 21 °C a 30 °C, ocorrem elevadas taxas de eclosão larvária, da longevidade das fêmeas, do número de ovos produzidos/fêmea e do número de gerações anuais, que pode chegar a 24 gerações. É importante ressaltar que na grande maioria dos municípios do Nordeste, inclusive Recife e Jaboatão dos Guararapes, as temperaturas usualmente mantêm-se nesta faixa.

Embora a forma mais freqüente de monitoramento de *Aedes* spp. por ovitrampas preconize seu uso por no máximo sete dias consecutivos, os resultados observados no bairro do Engenho do Meio, através do monitoramento contínuo em pontos fixos, em ciclos de 21 dias, durante 12 meses, mostraram que é possível detectar, rapidamente, tanto as pequenas quanto as grandes variações de densidades populacionais de *Aedes* spp., permitindo o acompanhamento da dinâmica de flutuações temporais de densidades. Os resultados deste estudo longitudinal mostram com clareza que cada imóvel é um caso particular, em termos da presença e abundância de *Aedes*. Situações de ausência do mosquito ou de sua presença em baixas ou em altas densidades foram registradas em imóveis contíguos, podendo permanecer neste mesmo status por períodos que variaram de um a seis meses. Esta observação sugere a importância das condições do micro-ambiente domiciliar em termos de disponibilidade de fontes de alimento (hospedeiros) e de locais de oviposição, reforçando observações anteriores, de que a dispersão ativa do vetor em áreas densamente habitadas parece ser pequena (HARRINGTON *et al.*, 2005). Em estudos sobre a dispersão de *Aedes* na Tailândia estes autores concluíram que mais de 70% das fêmeas tendem a permanecer no imóvel onde são liberadas, e as demais se deslocam para imóveis vizinhos localizados a menos de 100 m. Este e outros trabalhos concordam que existe uma forte associação entre a distribuição espacial dos imóveis e o padrão de dispersão de *A. aegypti* em áreas infestadas (GETIS *et al.*, 2003; TSUDA *et al.*, 2001). Tun-lin *et al.* (1995) e

Edman *et al.* (1998) sugerem que a dispersão ativa desta espécie está inversamente correlacionada com a disponibilidade de criadouros no ambiente.

Em Recife e Jaboatão dos Guararapes, caixas d'água, tanques e tonéis, presentes na maioria dos imóveis dos bairros estudados, são caracterizados como os criadouros mais frequentes para formas jovens do mosquito (SISTEMA DE INFORMACAO DE FEBRE AMARELA E DENGUE, 2008). Observações similares têm sido referidas para outras cidades brasileiras como Rio de Janeiro, onde estes são também os criadouros mais produtivos em qualquer estação do ano (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2007). É possível que a presença constante destes criadouros na maioria dos imóveis seja responsável pela manutenção da infestação nas áreas estudadas contribuindo para a permanência de *A. aegypti* no imóvel.

Embora os ovos coletados nas armadilhas indiquem a presença de fêmeas de *Aedes* em atividade reprodutiva, é difícil inferir, a partir da quantidade de ovos coletados, o número de fêmeas que depositou ovos na ovitrampa, o que permitiria estimar a densidade de fêmeas. Isto tem sido considerado uma limitação desta ferramenta (FOCKS, 2003; SERVICE, 1993). Técnicas moleculares têm sido propostas para estimar, indiretamente, o número de fêmeas de *A. aegypti*, pelo número de famílias identificadas a partir de ovos coletados nas ovitrapas (APOSTOL *et al.*, 1994, OLIVEIRA, 2005). Uma alternativa mais simples, porém ainda em fase de aperfeiçoamento para a vigilância e controle de *A. aegypti* é o uso de ovitrapas dotadas de substratos adesivos capazes de reter as fêmeas que visitam a armadilha (FACCHINELLI *et al.*, 2007; GAMA *et al.*, 2007; RITCHIE *et al.*, 2003).

Estudos a campo têm mostrado que alguns modelos de armadilhas para coleta de adultos podem ser eficientes para a detecção de espécies de *Aedes*, com vantagens relativas aos processos de contagem e identificação dos adultos, comparado a amostras de ovos (FACCHINELLI *et al.*, 2007; RUSSELL; RITCHIE, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2006a; WILLIAMS, *et al.*, 2006b).

Nossos resultados se somam a outros que evidenciam a simplicidade e superioridade das ovitrapas sobre os métodos atualmente empregados para o monitoramento de espécies de

Aedes, ressaltando a capacidade que estas armadilhas têm de diferenciar áreas quanto à intensidade de infestação e indicar, precocemente, imóveis com elevada densidade do mosquito, considerados sítios-chave para a manutenção da infestação (ACIOLI, 2007; BRAGA *et al.*, 2000; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2007; MORATO *et al.*, 2005; ROMERO-VIVAS; FALCONAR, 2005; TUN-LIN, 1995). Os resultados destes estudos indicam a necessidade urgente de substituir a pesquisa larvária, empregada na maioria dos programas de controle de *A. aegypti*, inclusive no PNCD, por outros métodos que sejam mais sensíveis e que produzam informações quantitativas mais substanciais sobre as populações do vetor, como a coleta de ovos, para ampliar a competência em vigilância entomológica.

3ª PARTE

5 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE POPULACIONAL DE *Aedes aegypti*

5.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de novas estratégias para o controle integrado de *Aedes* spp. em ambientes urbanos.

5.1.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar sob condições simuladas de campo a eficiência de um diferentes formas de apresentação de um produto à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), para controle de *A. aegypti*;
- ✓ Conhecer o potencial de reciclagem do Bti em criadouros de *A. aegypti*;
- ✓ Construir e testar em espaços urbanos com características sócio-ambientais distintas, nos municípios de Moreno e Recife, estratégias para o controle populacional de vetores, com base no uso integrado de larvicidas à base de Bti e coleta massiva de ovos através de armadilhas;

5.2 Estudo III: Avaliação de diferentes apresentações de um produto à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) em testes sob condições simuladas de campo

5.2.1 Procedimentos Metodológicos

Um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), cepa IPS82, foi avaliado neste estudo quanto a sua toxicidade para larvas de *Aedes aegypti*, em diferentes fases de sua produção, e quanto à influência de fatores bióticos e abióticos sobre a atividade larvicida residual de duas formulações. A metodologia do Teste sob Condições de Campo Simulado (TCS) seguiu os procedimentos descritos em Araújo *et al.* (2007) (Apendice B).

5.2.1.1 Produto experimental analisado

Amostras de pó primário (PP), pó técnico (PT) e comprimidos (C) contendo 15% de ingrediente ativo (IA), provenientes de diferentes lotes de produção do Antilarv[®], foram disponibilizados pela Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM) para avaliação neste estudo. O biolarvicida foi produzido por fermentação por imersão descontínua. A cultura foi produzida em um fermentador do tipo agitador e a biomassa bacteriana foi recuperada usando a técnica de floculação/sedimentação, para obter o IA, composto por esporos e cristas protéicas (LUNA; LOPES; MASSARANI, 2003). O caldo fermentado produzido foi centrifugado e seco a 35°C para obter o pó primário (PP). Ingredientes adjuvantes foram posteriormente adicionados ao PP para obter o pó técnico (PT), que foi utilizado sob esta forma, ou, em comprimidos de 250 mg. Este procedimento foi repetido para produzir 10 lotes do produto.

5.2.1.2 Mosquito-alvo

As larvas de 1° (L1) ou 4° estágio (L4) de *A. aegypti* utilizadas neste trabalho foram provenientes da colônia Recife-Laboratório (RecL), mantida no Insetário do CPqAM/FIOCRUZ desde 1996. As condições gerais de manutenção foram: 26 ± 2 °C, UR de 65% a 85%, fotoperíodo 12/12 (Claro/Escuro), sendo alimentadas com ração para gatos (Whiskas®) esterilizada e macerada.

5.2.1.3 Bioensaios de laboratório

O PP e o PT dos diferentes lotes foram avaliados quanto a sua atividade tóxica através de bioensaios *in vivo* contra L4. O bioensaio foi realizado de acordo com o protocolo padrão para avaliação de preparações de Bti (DE BARJAC; LARGET-THIÉRY, 1984). Grupos homogêneos de 20 L4 em recipientes com 100 ml de água destilada foram expostos a sete diferentes concentrações do produto em triplicata, por um período de 24 h. Três grupos permaneceram não tratados e serviram como controle do teste. As concentrações letais para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas foram estimadas por regressão linear, log-probit, pelo programa estatístico SPSS 8.0 para Windows (1997). Duas modalidades de ensaio foram realizadas neste estudo, a primeira, consistiu de um bioensaio exploratório realizado com o PT de todos os lotes e a segunda, três bioensaios realizados com três lotes selecionados com base em diferentes níveis de atividade tóxica. A CL₅₀ média serviu como parâmetro para determinar a potência do produto experimental, expressa em Unidades Tóxicas Internacionais (UTI/mg), comparada ao liofilizado padrão IPS82 do Instituto Pasteur. A Análise Exploratória de Dados foi utilizada para verificar diferenças entre os lotes de produção, considerando um intervalo de confiança de 95%.

5.2.1.4 Inativação dos esporos por radiação gama

Cinco amostras de 2 g do pó técnico, lote 10 receberam os seguintes tratamentos: 0 (amostra controle), 16, 18; 20 e 30 Kilogray (K Gy) de radiação gama, por um período máximo de 7,5 horas. Como fonte de emissão deste tipo de radiação foi utilizada a bomba de cobalto 60, no irradiador NordionGammacell 220, do Instituto de Pesquisas Energéticas e

Nucleares (IPEN). Para verificar o efeito das diferentes doses de radiação sobre a viabilidade dos esporos, duas alíquotas de 100 µl de uma suspensão 100 mg/ml de cada amostra irradiada foram plaqueadas em meio agar nutritivo (AN). As placas foram incubadas a 30°C, por 24 horas, de acordo com procedimento descrito por Becker (2002). A viabilidade microbiológica destas amostras foi verificada pelo crescimento bacteriano, expresso em UFC/ml, e sua relação com a radiação foi analisada por regressão linear (Software R, versão 2.1.1). Este procedimento permitiu selecionar a amostra com maior percentual de inativação de esporos e menor perda de atividade tóxica, em relação à amostra não irradiada, que foi posteriormente utilizada nos teste em campo simulado.

5.2.1.5 Testes sob condições simuladas de campo (TCS)

Amostras de PT, PT-irradiado (PTI) e de comprimidos de três lotes foram avaliadas sob condições simuladas de campo de acordo com a metodologia descrita por Araújo *et al.* (2007). Estes testes foram realizados para comparar diferentes lotes e diferentes formas de apresentação do produto (pó técnico e comprimido), quanto à atividade larvicida. As seguintes concentrações foram avaliadas: 250 mg de pó técnico/50 L de água e um comprimido de 250 mg/50 L de água bruta (de poço). Os experimentos foram realizados em recipientes plásticos transparentes (56,4 cm x 38,5 cm x 37,1 cm), preenchidos com 50 litros de água de poço, localizados em uma área coberta (96 m²) protegida da chuva (Figura 20). Para cada tratamento foram utilizadas três réplicas, além dos controles não tratados. A temperatura e o pH da água foram verificados três vezes/semana.

O acompanhamento da atividade larvicida em TCS foi feito segundo dois parâmetros: a) eficácia inicial, estimada pela mortalidade larval nas primeiras 48 horas após a aplicação do produto, utilizando 50 L4 jovens/recipiente; b) persistência, definida como o período em dias durante o qual a mortalidade foi $\geq 80\%$, estimada pelo número de pupas vivas, recuperadas após a introdução semanal ou mensal, de grupos de 50 L1/recipiente. O procedimento foi repetido durante 180 dias. Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados comparativamente pelo teste não paramétrico de Mann Whitney para duas amostras, ao nível de significância de 5%, utilizando o programa estatístico SPSS versão 8.0 para Windows (1997). Todos os testes realizados com o produto estão descritos no Quadro 1.

5.2.1.6 Avaliação dos efeitos de variáveis bióticas e abióticas sobre a atividade larvicida residual

5.2.1.6.1 Variáveis abióticas

A atividade larvicida residual do produto foi avaliada sob as seguintes condições: a) exposição à luz solar ou ao abrigo desta (sombra) e b) renovação ou não de água, com reposição de 20% ou 60% do volume, três vezes por semana (Quadro 1). Este último procedimento teve o intuito de simular a renovação de água pelo consumo doméstico, sendo retirada por torneiras e repostada através de um sistema de mangueiras, como descrito em Araújo *et al.* (2007) (Quadro 1).

5.2.1.6.2 Densidade larval

Recipientes tratados com o produto e sem renovação de água foram colonizados com grupos de 50 L1 com frequência semanal e mensal, para avaliar o efeito de diferentes densidades populacionais sobre a persistência do produto e a reciclagem bacteriana.

5.2.1.6.3 Reciclagem bacteriana

Recipientes tratados com PT ou PTI foram colonizados semanalmente com 50 L1 para acompanhar o efeito da presença de esporos de Bti (ativos ou inativos) sobre a performance do produto. A verificação do crescimento bacteriano nestes recipientes se deu pela contagem periódica de unidades formadoras de colônia (UFC/mg) em amostras retiradas dos recipientes tratados. Amostras de 5 ml de água foram coletadas em 3 pontos distintos no fundo dos recipientes, com 24 horas, 7 dias e a cada 30 dias após a aplicação de Bti. As amostras, após choque térmico (80°C/12 min e /0°C/5 min), usado para eliminar células vegetativas e bactérias não esporulantes da suspensão, foram submetidas à diluição seriada. Alíquotas de 5

μl das suspensões 10 , 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} foram semeadas em cinco pontos em placas de Petri contendo meio nutritivo agar e incubadas em estufa a 28°C por 18 a 20 h. As colônias de Bti foram contadas (UFC/ml) e os resultados analisados estatisticamente através do Programa DIFMED. Os valores médios de UFC/ml obtidos nos diferentes momentos de coleta foram comparados pelo Teste t-Student com nível de 5% de significância.

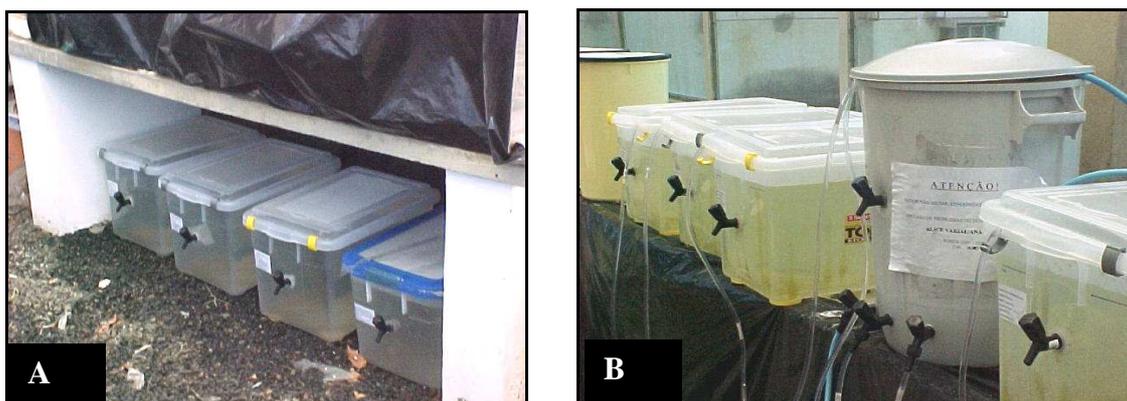


Figura 20- Recipientes plásticos usados para avaliar produtos experimentais à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, em testes sob condições simuladas de campo.

Nota: (A) recipientes colocados à sombra, (B) recipientes expostos ao sol e o sistema de renovação da água, usando mangueiras e torneiras.

Fonte: Araújo *et al.* (2007).

5.2.1.7 Determinação de estabilidade do produto

A estabilidade do produto em termos de tempo de prateleira foi investigada a intervalos de três meses por um período de dois anos. Comprimidos dos lotes 1 e 2 foram armazenados em oito embalagens individuais contendo 10 unidades cada e foram acondicionados em local seco, protegido da luz, com temperatura variando de 25°C a 27°C e umidade relativa de 60,0% a 80,0%. Três de cada 10 comprimidos das diferentes embalagens foram retirados para a avaliação da eficácia de controle em TCS, utilizando grupos de 50 L4, com registro de mortalidade após 48 h de exposição nos tempos acima referidos e avaliados quanto a sua eficácia inicial contra L4 em testes TCS. Os PT dos lotes 1 e 2 também foram avaliados por bioensaio no início e no fim do período de estudo para verificar possíveis perdas de atividade tóxica.



Figura 21- Embalagens do Antilarv®, produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), apresentado sob a forma de comprimidos, em embalagens individualizadas.
Fonte: Araújo *et al.*(2007).

Grupos	Formulações	Condições experimentais	Período de avaliação	Renovação de volume	Total de larvas
Lote 1	Pó técnico	Sol	Fevereiro – Maio/2005	20%	1.650
		Sombra	Fevereiro – Agosto/2005	0% e 20%	7.200
	Comprimido ^a	Sol	Fevereiro – Maio/2005	20%	1.650
		Sombra	Fevereiro – Agosto/2005	0%, 20% e 60%	10.800
Controle		Sol	Fevereiro – Maio/05	20%	1.650
		Sombra	Fevereiro – Agosto/05	0%, 20% e 60% ^c	3.600
Lote 10	Pó técnico	Sol	Setembro-Outubro/05	20%	600
			Novembro/05-Março/06	20%	2.550
		Sombra	Setembro/05 – Março/06	0%	3.600
	Pó técnico irradiado	Sombra	Setembro/05 – Março/06	0%	3.600
	Comprimido	Sol	Setembro-Outubro /05	20%	600
			Novembro/05-Março /06	20%	2.550
		Sombra	Setembro/05- Março/06	20%	3.600
Lote 5	Comprimido	Sombra	Setembro/05- Março/06	20%	3.600
Controle		Sol	Setembro-Outubro /05	20%	600
			Novembro/05-Março /06	20%	2.550
		Sombra	Setembro/05- Março/06	20%	3.600

Quadro 1- Descrição dos Testes sob Condições Simuladas de Campo (TCS) da atividade tóxica do produto experimental, Antilarv®, à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, para larvas de *Aedes aegypti*, linhagem ReCL.

^aComprimido contendo 15% de ingrediente ativo.

Fonte:Modificado de Araújo *et al.* (2007).

..

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Avaliação da toxicidade e da concentração de esporos viáveis

A Tabela 6 resume os valores de CL₅₀ e CL₉₀ das 10 amostras de pó técnico analisadas neste estudo.

Tabela 6- Atividade tóxica de amostras de diferentes lotes do pó técnico-Antilarv®, produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, estimada através de bioensaios contra larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*-Recife-Lab. Em média 480 larvas foram utilizadas em cada teste.

Lote-Pó Técnico	Valor p ¹	CL ₅₀ ² (mg/L) (IC 95%)	CL ₉₀ ³ (mg/L) (IC 95%)
01	0,621	0,144 (0,133 - 0,154)	0,204 (0,191 - 0,222)
07	0,631	0,155 (0,146 - 0,166)	0,237 (0,219 - 0,263)
09	0,330	0,203 (0,184 - 0,222)	0,372 (0,340 - 0,416)
08	0,469	0,233 (0,214 - 0,254)	0,387 (0,356 - 0,427)
10	0,961	0,237 (0,213 - 0,265)	0,436 (0,388 - 0,506)
06	0,530	0,246 (0,221 - 0,273)	0,415 (0,377 - 0,465)
02	0,722	0,254 (0,231 - 0,279)	0,419 (0,381 - 0,469)
05	0,839	0,437 (0,390 - 0,497)	0,786 (0,694 - 0,919)
04	0,647	0,439 (0,396 - 0,485)	0,799 (0,728 - 0,893)
03 ⁴		> 1,2	

¹P = probabilidade para um nível de 5% de significância. ²CL₅₀= Concentração letal para 50% das larvas.

³CL₉₀= Concentração letal para 90% das larvas. ⁴Lote desconsiderado para efeito de avaliação, por apresentar baixa atividade.

Fonte: Araújo *et al.* (2007).

Diferenças quanto à toxicidade entre os lotes de produção levaram ao reconhecimento dos seguintes níveis, em função dos valores de CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança: 1) 0,133 a 0,166 mg/L 2) 0,184 a 0,279 mg/L, 3) 0,390 a 0,497 mg/L e 4) >1,2 mg/L. A atividade observada para o pó técnico do lote 3 mostrou ser muito inferior a dos demais lotes, sendo portanto excluída das análises subsequentes (Figura 22A).

Uma LC_{50} média de $0,26 \pm 0,10$ mg/L foi estabelecida para o produto e sua potência, com base na CL_{50} do IPS82 (0,013 mg/L), foi de 750 UTI/mg. Os lotes 1 e 7 mostraram as melhores atividades larvicidas e os lotes 4 e 5 atividade ligeiramente menor do que a média (Figura 22B). A viabilidade microbiológica do pó técnico (PT) dos lotes 1, 5 e 10 foi similar, embora seus valores de LC_{50} diferissem em até 3,7 vezes (Tabela 7). Comprimidos produzidos com o PT dos lotes 1, 5 e 10 foram avaliados em Testes sob Condições Simuladas de Campo (TCS) para detectar possíveis alterações na performance em função das diferenças de toxicidade.

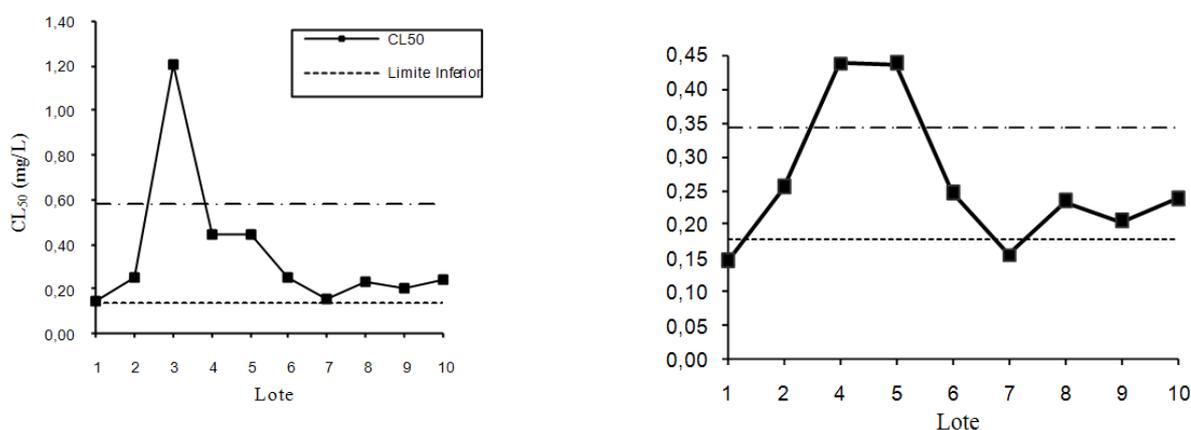


Figura 22- Valores de CL_{50} dos pós técnicos de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, em diferentes lotes de produção, mensurado por bioensaio com larvas de *Aedes aegypti*. A) Incluindo todos os lotes. B) Excluindo o lote 03, que foi considerado um valor extremo acima do limite superior do teste “outlier”.

Fonte: Araújo *et al.* (2007).

5.2.2.2 Desempenho do produto sob condições simuladas de campo

No TCS a eficácia inicial para ambos PT e C provenientes do lote 1 foi de 100%, e dos lotes 5 e 10 de 98,0%. A mortalidade no recipiente controle variou de 0 a 16,0%.

A persistência da atividade larvicida do PT e C em recipientes protegidos da radiação solar (à sombra) foi de 180 dias, eliminando todas as larvas, após um único tratamento. Ao final deste período, um grupo de 50 L4 foi adicionado a cada recipiente para verificar se o produto ainda apresentava atividade tóxica suficiente para eliminar larvas em estágio mais avançado de desenvolvimento, e o resultado foi um percentual de 99,1% de mortalidade. A atividade larvicida do lote 1 permaneceu inalterada diante da renovação semanal de até 60% do volume de água dos recipientes-teste, demonstrando que ambos PT e C eliminaram todas as larvas durante o período de seis meses.

Os formulados do lote 1, quando expostos ao sol, promoveram mortalidades que variaram de 55% a 100%, por 77 dias (fevereiro a maio/2005) (Figura 23). A mais baixa taxa de mortalidade foi registrada uma semana após o tratamento dos recipientes, coincidindo com o período mais seco e ensolarado, cuja insolação média foi de 9,2 horas de sol/dia (Figura 26).

Tabela 7- Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis de diferentes lotes do pó técnico-Antilarv®, produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, estimadas através de três bioensaios contra larvas de 4º estágio de *Aedes aegypti*-RecL e plaqueamento. Em média 1.440 larvas foram utilizadas nos três testes realizados para cada produto-lote.

Apresentação do produto-lote	CL ₅₀ ¹ (mg/L) Média±DP ³ (IC 95%)	CL ₉₀ ² (mg/L) Média±DP (IC 95%)	Viabilidade Microbiológica (UFC/ml) ⁴
Pó Técnico-lote 01	0,140 ± 0,004 (0,126 - 0,154)	0,241 ± 0,040 (0,220 - 0,269)	1,5 x 10 ⁷
Pó Técnico-lote 05	0,514 ± 0,097 (0,465 - 0,573)	0,889 ± 0,161 (0,797 - 1,02)	1,3 x 10 ⁷
Pó Técnico-lote 10	0,245 ± 0,014 (0,207 - 0,298)	0,436 ± 0,002 (0,373 - 0,575)	2,5 x 10 ⁷
Liofilizado-IPS82 ⁵	0,013 ± 0,002 (0,011 - 0,015)	0,026 ± 0,004 (0,023 - 0,031)	4,2 x 10 ⁹

¹CL₅₀= Concentração letal para 50% das larvas; ²CL₉₀= Concentração letal para 90% das larvas; ³Desvio padrão

⁴UFC = unidade formadora de colônia por mililitro; ⁵IPS82 = liofilizado padrão para preparações à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

Fonte: Araújo *et al.* (2007).

Quando o mesmo produto foi testado de novembro/2005 a março/2006, a taxa de mortalidade variou de 66% a 97% por 17 semanas (Figura 25). Em todos os testes conduzidos ao sol, o nível de 100% de mortalidade só foi observado na semana do tratamento.

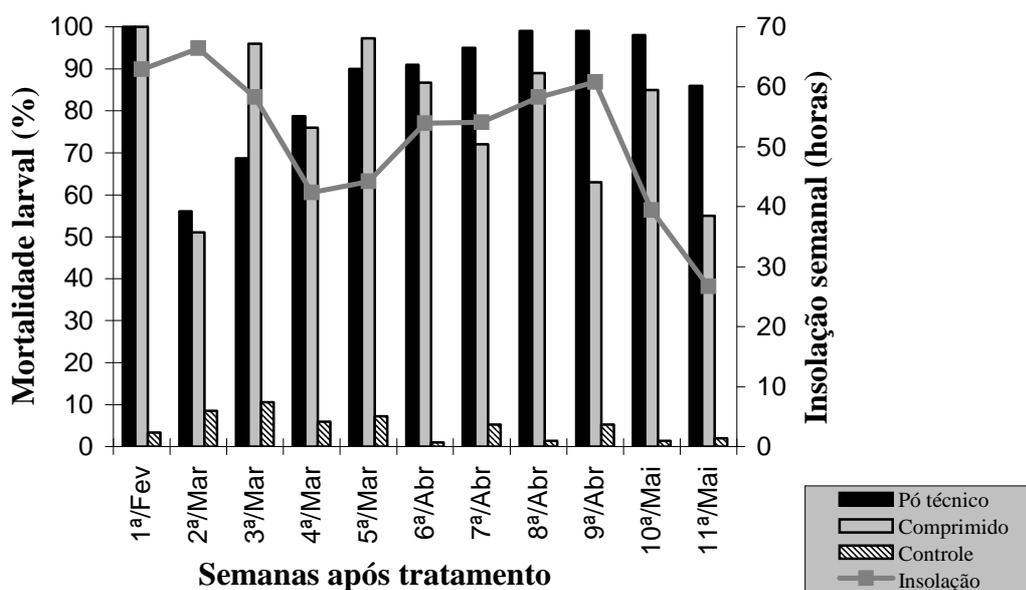


Figura 23- Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 01 à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* mensurada para larvas de 1º estágio de *Aedes aegypti*, em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade comparados com o nível de insolação semanal, registrado de fevereiro a maio de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE. Fonte: Araújo *et al* (2007).

A temperatura da água nos recipientes variou de 26,5 a 31,3 °C ao sol e de 26,3 a 29,8 °C à sombra, ao longo do período de avaliação. O pH da água oscilou de 6,9 a 9,9 e de 6,9 a 8,4 nos recipientes expostos ao sol e à sombra, respectivamente. O PT e o C do lote 10 testados de setembro a outubro de 2005 mostraram uma diminuição rápida e progressiva da mortalidade larval na segunda semana, com perda total da atividade até a 4ª semana (Figura 24). Mais uma vez, o decréscimo da atividade larvicida esteve relacionado ao aumento do número de horas de sol/dia (Figura 26).

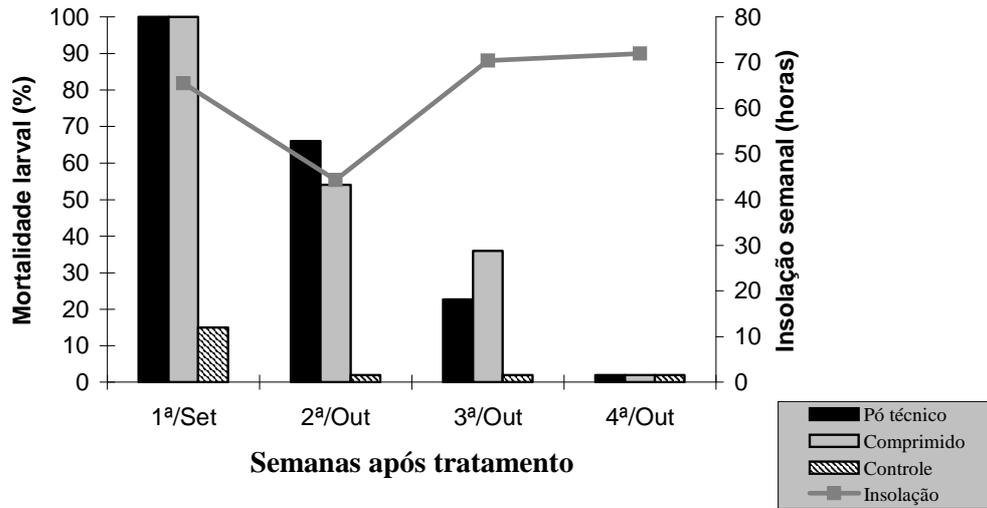


Figura 24- Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* mensurada contra larvas de 1º estágio de *Aedes aegypti*, em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade associados com o nível de insolação semanal, registrado de setembro a outubro de 2005. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.

Fonte: Araújo *et al.*, 2007.

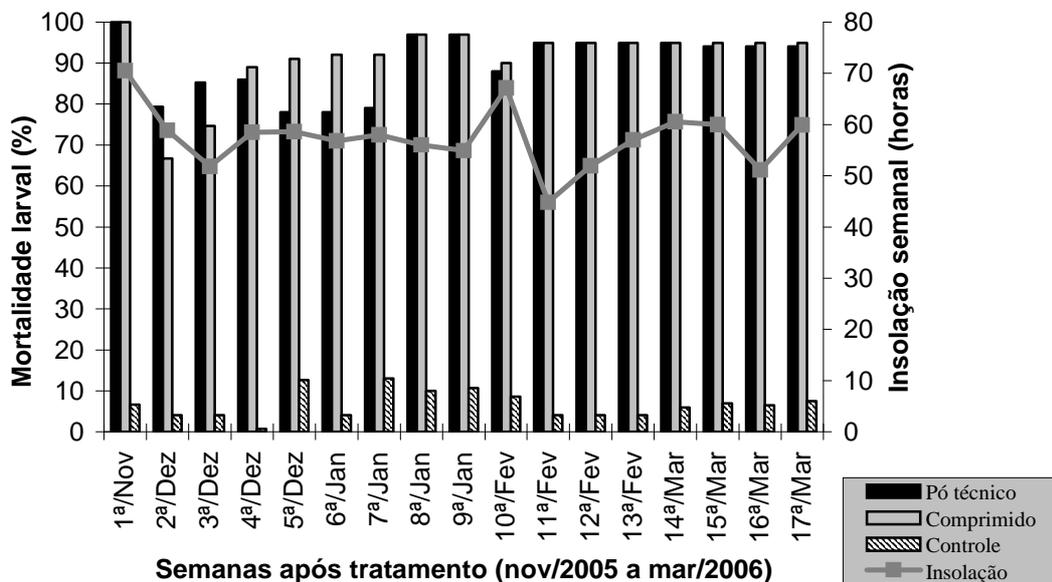


Figura 25- Atividade larvicida residual do pó técnico e do comprimido-lote 10 à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* mensurada contra larvas de 1º estágio de *Aedes aegypti*, em testes sob condições de exposição solar direta. Valores de mortalidade associados com o nível de insolação semanal. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.

Fonte: Araújo *et al.*, 2007.

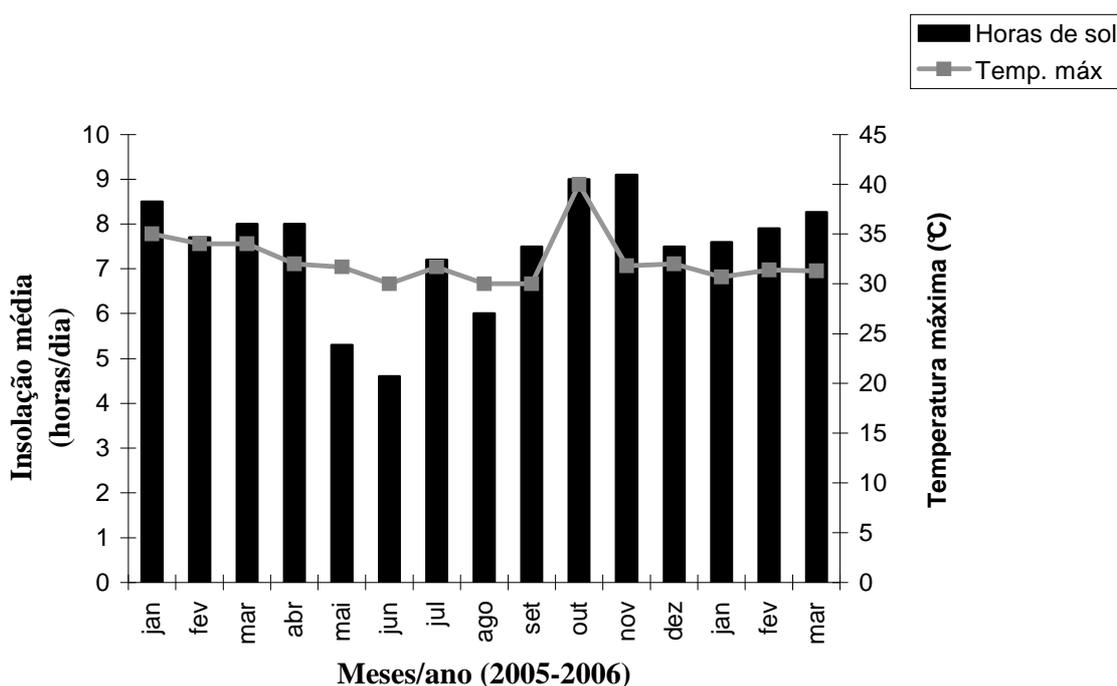


Figura 26- Insolação média e temperatura máxima registradas nos meses de janeiro de 2005 a março de 2006, na Região Metropolitana do Recife. Dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Estação Curado/Recife-PE.

Fonte: Araújo *et al.* (2007).

Os testes de estabilidade não demonstraram nenhuma alteração na eficácia inicial do produto sob TCS, ao longo de dois anos. A mortalidade larval promovida pelo uso das amostras do produto, acondicionadas sob as condições preconizadas, permaneceu acima de 97% durante os 24 meses (Tabela 9). Entretanto, uma redução na atividade larvicida do PT foi detectada através da avaliação por bioensaios em laboratório após dois anos de armazenamento do produto. O valor de LC₉₀ do lote 1 passou de 0,24 mg/L para 0,46 mg/L e do lote 2 de 0,42 mg/L para 0,79 mg/L, portanto, após o armazenamento foi detectada uma perda de atividade tóxica na ordem de duas vezes.

5.2.2.3 Efeito dos raios gama sobre a viabilidade de esporos e toxicidade do Bti

A análise de regressão da viabilidade de esporos nas amostras expostas às doses 16, 18, 20 e 30 KGy de radiação gama, revelou uma redução significativa ($R^2 = 0,811$) do número de

esporos viáveis em função da dose empregada, gerando uma correlação negativa entre estas variáveis ($r = -0,9$) (Figura 27) e (Tabela 10). A maior dose utilizada reduziu em 99,9% os esporos viáveis. Com base nos resultados de bioensaios com L4 de *Ae. aegypti*, as diferentes amostras irradiadas apresentaram uma redução de 20% até 83% da atividade larvicida, quando comparadas com a CL_{50} (0,26 mg/L) do material não irradiado (Tabela 10). Esta redução da toxicidade apresentou clara relação dose-efeito ($r = 0,77$) (Figura 27).

A amostra de PTI do lote 10 irradiada com 20 KGy apresentou o maior índice de inativação de esporos (99,9%) e a menor redução da atividade larvicida (Tabela 10), cuja CL_{50} média foi de $0,45 \pm 0,07$ mg/L. Este PTI quando testado em TCS promoveu, 24 h após o tratamento, 90% de mortalidade larval, percentual não muito inferior ao observado para o PT não irradiado (98%). A partir do 7º dia de experimento, ambos, PT e PTI, promoveram 100% de mortalidade larval até o final do experimento, aos 180 dias após um único tratamento (Figura 28 e 29).

Um dia após o início do experimento, a concentração de esporos nos recipientes tratados com o PT foi da ordem de 5×10^5 UFC/ml (Figura 28). Aos sete dias sofreu uma discreta redução, mantendo-se, entretanto, em valores superiores a 1×10^4 UFC/ml nos 6 meses subsequentes. Nos recipientes tratados com PTI, não foram detectadas colônias de Bti nas amostras colhidas 24 h após tratamento (Figura 28). A partir do 7º dia, entretanto, a presença de esporos viáveis foi registrada em todas as réplicas, em todos os momentos avaliados, mantendo-se a concentração bacteriana entre 2×10^2 e 7×10^2 UFC/ml (Figura 28). A concentração bacteriana observada nestes recipientes foi quase sempre significativamente menor ($p < 0,05$) do que nos recipientes tratados com PT, entretanto, nas contagens feitas aos 90 e aos 180 dias, a concentração de esporos não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ($T=3,2$ e $3,0$ respectivamente) ($p > 0,05$). A temperatura da água nos recipientes variou de $26,3^\circ$ a $29,8^\circ\text{C}$ e o pH entre 6,9 e 8,4 ao longo do teste.

5.2.2.4 Efeito da frequência de colonização

A persistência da atividade larvicida do comprimido em recipientes com introdução semanal ou mensal de larvas durou pelo menos 180 dias, em recipientes à sombra, com 100%

de mortalidade larval, desde a 1ª avaliação até o final do experimento, independentemente da quantidade de larvas introduzidas no período.

Durante todo o período de avaliação, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na concentração de esporos entre recipientes colonizados semanal ou mensalmente (Figura 29). Um dia após a aplicação do comprimido, a concentração de esporos nos recipientes colonizados com frequência semanal e mensal foi, respectivamente, $1,3 \times 10^2$ e $7,9 \times 10^1$ UFC/ml. Em ambos os tratamentos, os valores de UFC/ml se elevaram aos 7 dias, decresceram ao final de um mês, retomando o crescimento bacteriano até 60 dias e permanecendo em nível elevado ($1,2 \times 10^4$ UFC/ml a $2,8 \times 10^4$ UFC/ml) até 6 meses após a aplicação do comprimido (Figura 29).

Tabela 8- Persistência de diferentes formulações, pó técnico (PT) e comprimido (C), de um produto experimental à base *Bacillus thuringiensis israelensis*, contra larvas de *Aedes aegypti*-Recife-Lab em recipientes colocados à sombra, de fevereiro/2005 a março/2006.

Grupo	Período de avaliação	Apresentação	Nº larvas	Período de avaliação ¹ (dias)	Mortalidade ² larval (%) no período $\bar{X} \pm DP^3$
Lote-01	fev-ago/05	Pó Técnico			
		Comprimido	3.600	180	100
Controle ⁴	fev-ago/05	_____	3.600	180	$4,6 \pm 0,64$
Lote-05	set/05-mar/06	Comprimido	3.600	180	100
Lote-10	set/05-mar/06	Comprimido	3.600	180	100
Controle	set/05-mar/06	_____	3.600	180	$4,4 \pm 0,41$

¹ Período após um único tratamento com o produto, durante o qual a mortalidade larval foi superior a 80%. ² Mortalidade larval durante o período. ³ Média \pm Desvio padrão. ⁴ Sem tratamento com Bti.

Tabela 9 – Atividade tóxica de comprimidos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, provenientes de dois lotes de produção, mantidos em temperatura ambiente variando de 25° a 27° C e umidade relativa de 60% a 80%, para larvas de *Aedes aegypti*. Os testes foram realizados a intervalos de três meses por um período de 24 meses.

Comprimido	Mortalidade larval (%) ^a /trimestre								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
01	98.7 ± 1.1	100.0	98.7 ± 1.1	100.0	98.7 ± 1.1	98,7± 1.1	99,1± 0.5	100.0	100.0
02	99.1 ± 0.5	98.7 ± 1.1	100.0	100.0	100.0	99,1±	100.0	100.0	100.0
00 (controle)	0	1.0 ± 1.4	0	0.5 ± 0.7	1.0 ± 1.4	1.0 ± 1.4	0	0	0

^aMédia ± Desvio Padrão

Fonte: Araújo *et al.* (2007).

Tabela 10 - Atividade tóxica e concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* observada para o pó técnico submetido à radiação gama, mensuradas através de bioensaios de laboratório e determinação do número de esporos viáveis (UFC/ml), respectivamente.

Dosagem (KGy)	Número de esporos viáveis (UFC/ml) ² ± DP ³	CL ₅₀ ⁴ (mg/L) (Intervalo de confiança 95%)	Perda de toxicidade (%)
0 ¹	4.400.000.000 ± 148,49	0,26 (0,168-0,344)	0
16	40 ± 14,14	0,30 (0,251 – 0,379)	14,4
18	20 ± 14,14	0,38 (0,314 – 0,470)	31,5
20	5 ± 7,0	0,45 (0,314 – 0,432)	42,2
30	5 ± 7,0	1,41 (1,28 – 1,58)	81,6

0¹ = amostra não irradiada (controle); ²UFC= unidade formadora de colônia; ³ Desvio Padrão; ⁴ CL₅₀= Concentração letal para 50% das larvas.

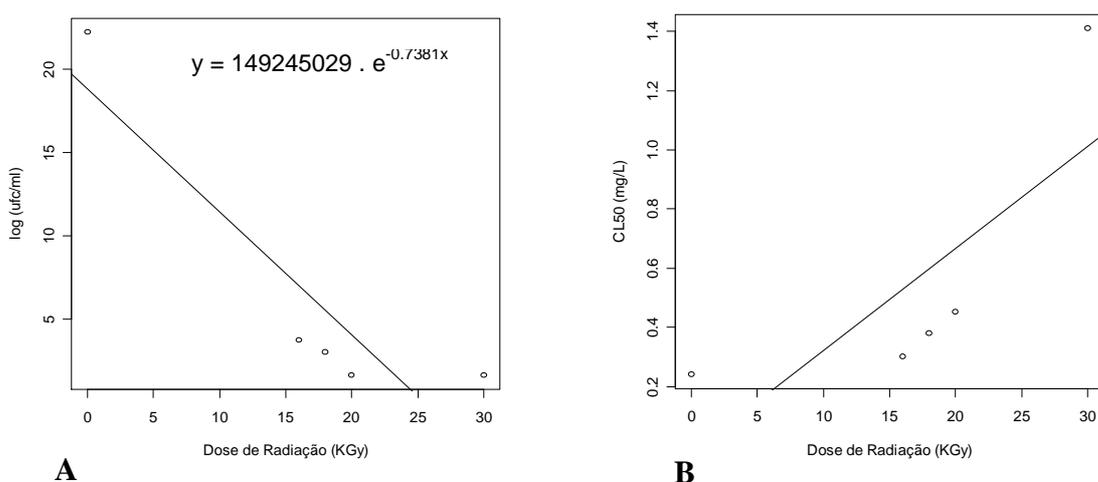


Figura 27 - Relação entre diferentes doses da radiação gama e a viabilidade dos esporos (A) e toxicidade (B) do pó técnico de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, avaliada pelas unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e pelas concentrações letais (CL₅₀) em bioensaios contra larvas de *Aedes aegypti*-Recife-Lab.

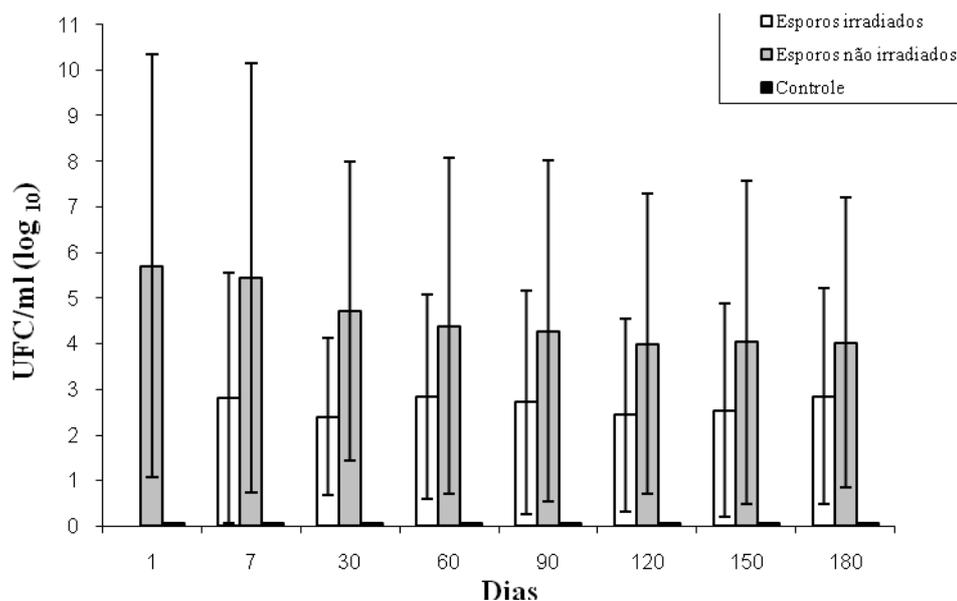


Figura 28 - Concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* em recipientes tratados com pó técnico do produto experimental, contendo esporos ativos ou irradiados (20 KGy de radiação gama), deste patógeno, em ensaios de atividade contra larvas de *Aedes aegypti*. Os recipientes foram mantidos ao abrigo do sol, com reposição de 20% do volume de água três vezes por semana.

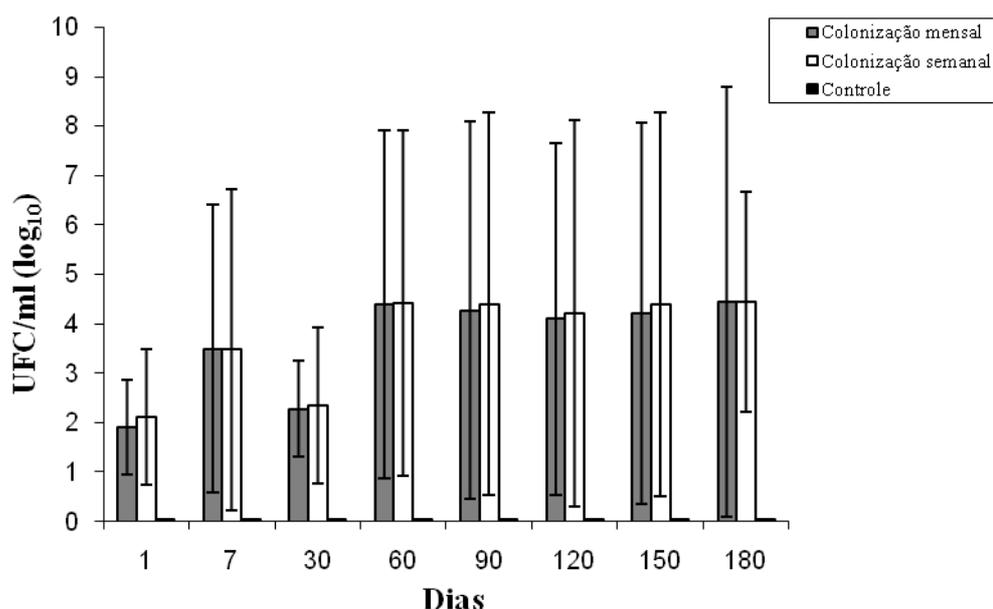


Figura 29 - Concentração de esporos viáveis em recipientes tratados com o comprimido de um produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, mantidos ao abrigo do sol, sem renovação de água, colonizados com larvas de *Aedes aegypti* em intervalos semanais ou mensais.

5.2.3 Discussão

O produto Antilarv® avaliado neste trabalho sob a formulação de pó técnico e comprimido mostrou excelente atividade tóxica para *A. aegypti*, com longa persistência sob condições simuladas de campo, principalmente em recipientes à sombra, mantendo-se estável quanto a sua atividade tóxica após dois anos de armazenamento.

As CL₅₀ das amostras de PT produzidos sob condições padronizadas mostraram variações de até 3,7 vezes entre os lotes. Em nove dos dez lotes o nível de toxicidade foi aceitável, dois deles tinham atividade maior do que a média estimada (LC₅₀=0,26 ±0,1 mg/L) e dois menores do que esta. A literatura sobre produção de bactérias entomopatogênicas registra variações de toxicidade inerentes ao processo de produção especialmente ligadas a fatores como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e concentração de açúcar durante a fermentação ou a perda de cristais protéicos durante a recuperação da biomassa bacteriana e sua formulação (COUCH, 2000; SKOVMAND; THIÈRY; BENZON, 2000). De acordo com Skovmand *et al.* (1997) (SKOVMAND; THIÈRY; BENZON, 2000), nem sempre há uma correlação entre a concentração de esporos e a quantidade de cristais produzidos durante a fermentação. Esta foi sem dúvida uma das razões para substituir este parâmetro no processo de padronização da toxicidade de produtos. Nossos resultados concordam com esta observação, visto que nenhuma correlação clara foi encontrada entre estes parâmetros nos diferentes lotes analisados (Tabela 7).

Nos testes em campo simulado, as amostras de PT e C de três lotes com toxicidades diferentes demonstraram desempenho similar em recipientes à sombra, sugerindo que as diferenças observadas entre as CL₅₀ não foram suficientes para afetar a atividade larvicida residual em campo. Alguns estudos sugerem que a potência de um produto pode não ser um indicador acurado do seu desempenho em campo (VILARINHOS; MONNERAT, 2004). A potência do produto é de toda forma um parâmetro que deve ser observado na padronização do processo de produção e deve variar o mínimo possível (HABIB *et al.*, 1998; SKOVMAND; THIÈRY; BENZON, 2000; SKOVMAND *et al.*, 1997).

Durante o processo de produção de um entomopatógeno como o Bti, é esperado que ocorra um aumento da atividade tóxica como resultado da concentração de esporos e cristais

ao término da fermentação. Por outro lado, em estágios mais avançados do processo de produção, mais especificamente os relacionados à secagem e formulação, é esperada uma redução ou estabilização da toxicidade (COUCH, 2000). Em nosso estudo, a compressão do PT para obter os comprimidos parece não ter levado a uma perda de atividade, indicando que o processo não danificou ou impediu a liberação do ingrediente ativo. Produtos em forma de comprimido são de fácil operacionalização em campo por não requererem equipamentos para sua aplicação, por reduzirem o risco de falhas na dosagem e minimizarem as perdas durante a aplicação em campo. Segundo Becker (2003), o desenvolvimento de formulações sólidas do tipo grânulos, roscas, comprimidos e outras, bem como metodologias mais apropriadas à aplicação destes, podem gerar vantagens operacionais em programas de controle, relativas a maior estabilidade dos produtos, facilidade de armazenamento, transporte e aplicação em campo. Formulações do tipo comprimido podem ser ainda mais adequadas às características particulares de alguns criadouros, como por exemplo, os depósitos de água limpa, freqüentemente colonizados pelo *A. aegypti*, cuja aplicação não promove modificações aparentes na água e não geram resíduos sólidos nos recipientes, o que favorece a aceitação pela população (BECKER, 2000; MELO-SANTOS *et al.*, 2001a).

Os comprimidos permaneceram eficazes após dois anos de armazenamento, sugerindo que características relacionadas à atividade larvicida do patógeno e à taxa de liberação do ingrediente ativo permaneceram estáveis o suficiente para promover elevada mortalidade larval. Mesmo assim, esta modalidade de teste por estar baseada no uso de doses de campo, que geralmente são 10 ou mais vezes maiores do que a $ÇL_{90}$, não seria a mais indicada e sensível para detectar pequenas perdas de toxicidade do produto.

Os tipos mais freqüentes de criadouros de *A.aegypti* no Brasil são os depósitos domésticos de água, localizados na área peridomiciliar do imóvel, parcial ou totalmente cobertos com uma tampa, embora nem sempre sejam capazes de impedir a entrada e saída de mosquitos, com renovação freqüente da água em função do consumo doméstico ou da intermitência de abastecimento. Assim, em nosso desenho experimental optamos por simular o uso da água e a exposição ao sol para nos aproximarmos das condições locais de campo. A colonização dos recipientes foi feita com L1 para aumentar a sensibilidade do teste (MELO-SANTOS *et al.*, 2001b).

O PT e o C do Antilarv®, expostos ou não ao sol, promoveram a mesma eficácia inicial de controle (mortalidade de 98% a 100%), indicando que o produto formulado liberou

quantidade satisfatória de cristais protéicos na zona trófica das larvas nas primeiras 48 h após sua aplicação. Esta característica é extremamente importante para garantir que o larvicida comece a atuar rapidamente, poucas horas após sua aplicação, visto que, em condições de campo, larvas de diferentes estádios de desenvolvimento podem estar presentes em um mesmo criadouro. Na sombra, os produtos permaneceram 100% eficazes por seis meses mesmo com a renovação periódica de 60% da água tratada, que poderia ter abreviado a atividade residual do produto em decorrência da sua diluição durante os 180 dias de avaliação. Uma provável explicação para este comportamento é a mesma relatada por Benjamin *et al.* (2005), para o comprimido VectoBac DT[®], testado em recipientes de argila, que foram também submetidos a renovação da água (50%). Os autores observaram que o produto sedimentava rapidamente e os cristais e esporos do Bti ficavam agregados nas paredes laterais e no fundo do recipiente de forma que a água retirada continha pouco ou nenhum cristal/esporo de Bti. Em nossos experimentos também foi observado rápida sedimentação do comprimido e sua permanência no fundo do recipiente até sua completa desintegração.

Na literatura poucos são os relatos de longa persistência para produtos à base de Bti. Mulla *et al.* (2004) registraram excelente controle de larvas de *A. aegypti* em jarras de argila, por um período de 112 dias. Benjamin *et al.* (2005) referiram, em recipientes da mesma natureza, persistência de 166 dias. É consenso que a atividade residual de biolarvicidas e inseticidas de síntese é fortemente influenciada pelas condições ambientais. A viabilidade dos esporos é um importante fator porque sob condições favoráveis, a reciclagem destas bactérias pode ocorrer no cadáver larval levando à produção de novas toxinas (ALY, 1985; ALY *et al.*, 1985; KHAWALED *et al.*, 1988).

Os resultados deste estudo confirmam o efeito negativo da radiação solar sobre a persistência do Bti, como observado em estudos prévios (MELO-SANTOS *et al.*, 2001; NAYAR *et al.*, 1999; OBETA, 1996; THIÉRY *et al.*, 1999; VILARINHOS; MONNERAT, 2004). Os testes realizados durante o período de maior incidência solar (outubro/2005) mostraram uma rápida diminuição da taxa de mortalidade larval, que caiu para menos de 70% na segunda semana com perda total da atividade na quarta semana após o tratamento. Resultados similares foram observados em estudos anteriores em áreas externas abertas (MELO-SANTOS *et al.*, 2001; VILARINHOS; MONNERAT, 2004).

Nos recipientes expostos ao sol, mudanças de alguns aspectos da qualidade da água, como crescimento de microalgas e aumento da alcalinidade, foram observadas após a primeira

semana de tratamento. A presença de microorganismos e detritos em suspensão no ambiente aquático pode afetar a disponibilidade do biolarvicida devido à adsorção de esporos e cristais de Bti ou Bs às partículas, antes que elas sedimentem nos recipientes (SHEERAN; FISHER, 1992; SKOVMAND; BAUDUIN, 1997). Além disso, o pH muito alcalino favorece a solubilização dos cristais protéicos tornando as pro-toxinas expostas à degradação. A associação destes fatores pode ter contribuído para reduzir a atividade larvicida do produto, especialmente quando a radiação solar alcançou níveis ≥ 9 h contínuas de sol por dia. Por outro lado, o prolongado controle larval observado sob condições ambientais específicas, sugere que a reciclagem do Bti é capaz de compensar parcialmente a perda de toxicidade dos cristais causada pela radiação ultravioleta ou outros fatores deletérios.

Nos testes com exposição solar realizados em outros períodos do ano, a persistência foi surpreendentemente longa: 77 a 119 dias. Desconsiderando o limite de mortalidade (80%) previamente estabelecido, a continuidade da avaliação visando confirmar a perda de atividade do produto, revelou, ao contrário, a retomada da atividade, deixando evidente que a interrupção da avaliação naquele momento poderia ter levado a uma interpretação errônea da persistência. Com efeito, a atividade larvicida foi recuperada na segunda semana após o tratamento, mantendo taxas de mortalidade acima de 80%, por até 17 semanas.

A reciclagem bacteriana pode ter um importante papel na persistência. Os experimentos conduzidos com o pó técnico e o comprimido do produto experimental Antilarv®, indicam longa persistência da atividade larvicida residual contra *A. aegypti*, concomitante com elevadas concentrações de esporos viáveis da bactéria observadas durante seis meses após aplicação de uma única dose, em recipientes periodicamente colonizados com L1 e mantidos à sombra, com ou sem renovação periódica parcial da água.

Com efeito, foi constatado que a realização de um único tratamento resultou na manutenção de concentrações de esporos de Bti sempre superiores a 10^4 UFC/ml, capazes de causar mortalidade de todas as larvas introduzidas nos recipientes durante 180 dias. Embora tenham sido utilizadas doses equivalentes, há nítidas diferenças na evolução de concentração de esporos durante o primeiro mês, quando se compara o PT com o comprimido. Nos recipientes tratados com PT, as maiores concentrações de esporos foram detectadas 24 h após tratamento, registrando-se uma discreta queda aos 7 dias, e estabilizando-se em torno de 10^4 UFC/ml a partir de 30 dias até o 6º mês. No caso do comprimido, devido ao fato do princípio

ativo estar agregado promovendo lenta liberação, a menor concentração de esporos foi observada 24 h após tratamento, seguida de flutuações no 1º mês, e estabilizando-se, a partir dos 60 dias, em concentrações similares às observadas nos recipientes tratados com PT. O aumento da concentração bacteriana observada no período entre 30 e 180 dias após tratamento com o comprimido é uma clara evidência da reciclagem bacteriana. De fato, aos 180 dias a concentração bacteriana foi 100 vezes maior do que aos 30 dias.

É importante ressaltar que, apesar das diferenças observadas nas concentrações iniciais de esporos, a mortalidade larval foi total desde as 24h até 180 dias após tratamento, independentemente da forma de apresentação do produto, PT ou comprimido. Estes resultados são indicadores da ocorrência de reciclagem do Bti, ou seja, de multiplicação bacteriana acompanhada de produção de toxinas e sua disponibilidade na zona trófica das larvas *A. aegypti*. Os resultados dos experimentos com PT irradiado reforçam a ocorrência de reciclagem bacteriana: ao aplicar PTI contendo apenas 0,1% dos esporos viáveis (99,9% inativados por irradiação gama), não foram detectados esporos nos recipientes 24h depois, porém a partir da avaliação feita aos sete dias, e até o final do 6º mês, concentrações de esporos oscilando entre 10^2 a 10^3 UFC/ml foram mantidas, com sustentação do controle larval total nos recipientes.

Quando amostras de PP foram irradiadas com 20 e 30 KGy um pequeno crescimento bacteriano foi detectado no plaqueamento. Quando estas amostras foram testadas em campo simulado não foram detectadas unidades formadoras de colônias nas primeiras 24 h, porém 7 dias depois, nos recipientes tratados foi assinalado um baixíssimo crescimento bacteriano, na ordem de 100 e 40 UFC/ml, para as respectivas doses testadas. Nas avaliações subsequentes a concentração bacteriana aumentou ao longo do tempo. Os dados sugerem que a quantidade de esporos viáveis no produto irradiado foi suficiente para promover a reciclagem do patógeno nos cadáveres larvais.

A capacidade de reciclagem de bactérias entomopatógenas do gênero *Bacillus*, principalmente do *B. sphaericus*, em criadouros de culicídeos, multiplicando-se nos cadáveres das larvas destes insetos, foi documentada na década de 1980 (NICOLAS; DARRIET; HOUGARD, 1987). Em um dos raros estudos sobre reciclagem de Bti, Aly *et al.* (1985) estimaram que uma L4 morta de *A. aegypti*, pode conter, 72 h após ingestão de Bti, de $7-14 \times 10^4$ esporos desta bactéria. A observação de que nem sempre a reciclagem bacteriana com

ciclo completo de esporulação e produção de toxinas mosquitocidas resulta em disponibilidade destas toxinas na zona de alimentação das larvas, parece ter levado a um desinteresse pelo tema. É importante sublinhar que a ausência de contato das larvas de mosquito com bactérias que se multiplicam no fundo de habitats com certa profundidade, é certamente uma ocorrência freqüente no caso do *Culex*, cujas larvas se alimentam na região superficial da água. Ao contrário as larvas de *Aedes* se alimentam mais freqüentemente no fundo e nas paredes dos recipientes, o que facilita a ingestão de cristais e esporos de Bti resultante de reciclagem no fundo dos habitats aquáticos.

Uma vez que Bs e Bti se multiplicam dentro das larvas mortas de mosquitos, espera-se que a densidade larval nos recipientes tratados com estas bactérias influencie o processo de reciclagem. Nos experimentos com introdução de larvas de *Aedes* a cada semana (somando 1.200 larvas/ recipiente em seis meses) ou a cada mês (300 larvas/ recipiente) o controle larval foi total durante os seis meses de observação e a concentração bacteriana foi semelhante nos dois grupos, independentemente da densidade de larvas nos recipientes. Sugerindo que as 300 larvas foram suficientes para garantir um nível de reciclagem capaz de promover controle total, e que fatores ambientais no habitat possivelmente agiram na regulação do tamanho da população bacteriana. Estudos realizados em laboratório e em campo mostraram que em ambientes com altas densidades de larvas, quantidades maiores de produtos bacterianos são necessárias para promover controle completo, indicando que a densidade de larvas da espécie-alvo é um dos fatores capazes de influenciar negativamente a atividade larvicida de produtos bacterianos (BECKER *et al.* 1992; MULLA 1990; NAYAR *et al.* 1999). Neste sentido, pode-se também considerar a possibilidade de maior produção bacteriana ocorrendo nos recipientes mais densamente povoados, porém com ingestão mais intensa de bactérias pelas larvas recém-introduzidas, possivelmente um entre outros reguladores de tamanho populacional do Bti.

Neste, como em estudos anteriores (ARAÚJO *et al.* 2003, 2007; MELO-SANTOS *et al.* 2001.), foram utilizadas L1, em vez de L4, para o acompanhamento de persistência da toxicidade do Bti em experimentos em campo simulado. Isto é importante, porque simula a situação real de campo e, por serem as L1 mais sensíveis ao Bti, seu uso aumenta a sensibilidade dos testes de persistência (MELO-SANTOS *et al.* 2001a). Parece cada vez mais claro que desenhos experimentais para avaliar larvicidas biológicos devem buscar aproximar, o mais possível, o experimento das condições reais nas quais o larvicida vai ser utilizado. A retirada das larvas mortas dos recipientes tratados, para contagem, um procedimento algumas

vezes utilizado, impede que a reciclagem ocorra, podendo levar a subestimar a persistência da atividade tóxica. Outra prática que pode introduzir equívocos na determinação da persistência é interromper a avaliação no primeiro momento em que a mortalidade cai para valores inferiores a 90%, comumente adotado como ponto de corte na avaliação destes biolarvicidas. Os experimentos de Araújo *et al.* (2007) demonstram que a atividade larvicida residual do Bti pode oscilar ao longo do tempo e manter-se em níveis de 100%, quando as condições ambientais favorecem a retomada de crescimento bacteriano. Tempos de persistência superiores a quatro meses têm sido observados em experimentos que levam em consideração aspectos bióticos deste larvicida (ARAÚJO *et al.*, 2007; BENJAMIN *et al.*, 2005; MULLA *et al.* 2004; SETHA *et al.*, 2007).

Uma questão levantada durante os testes para verificação da reciclagem bacteriana foi se a quantidade de larvas adicionadas aos recipientes experimentais, sobretudo os colonizados semanalmente, não favoreceria este processo e induziria a uma situação muito diferente da encontrada em campo. Estudos recentes que envolvem o monitoramento populacional de *Aedes* em espaços urbanos brasileiros têm revelado níveis altos de infestação, geralmente com elevadas densidades populacionais (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2007, REGIS *et al.*, 2008; RÍOS-VELASQUEZ *et al.*, 2007). Em Recife-PE o monitoramento da distribuição espaço-temporal do *Aedes* com 464 ovitrampas, mostrou que é freqüente a coleta de mais de 1.000 ovos por casa durante um mês (REGIS *et al.* 2008). Nestas circunstâncias, a adição de 50 ou mesmo 200 larvas de *Aedes* em um recipiente por mês, como foi feito neste trabalho, não parece se distanciar da pressão de colonização de criadouros que ocorre em situação de campo.

Os resultados deste e de outros trabalhos realizados nos últimos anos permitem reafirmar que produtos à base de Bti são os melhores larvicidas atualmente disponíveis contra *Aedes* spp. Além de não selecionar resistência nas populações-alvo, o Bti pode funcionar como estimulante de oviposição (SANTOS *et al.*, 2003, STOOPS, 2005), e quando usado em recipientes à sombra, como é o caso de muitos criadouros domésticos do *A. aegypti* e *A. albopictus*, pode persistir causando alta mortalidade larval por vários meses. É importante lembrar que o uso de larvicida como única medida de controle jamais será suficiente para reduzir a densidade populacional de *A. aegypti*, sendo indispensável, para obter bons resultados, a integração de outras medidas de controle (REGIS *et al.*, 2008).

5.3 Estudo IV: Estratégia para o controle integrado de *Aedes* spp. implementada no município de Moreno-PE

5.3.1 Procedimentos Metodológicos

5.3.1.1 Caracterização da área

Moreno (8°10'00"S e 35°05'15"O) é um dos 14 municípios da Região Metropolitana do Estado de Pernambuco, localizado a 30,6 km do Recife. Possui 56.650 habitantes e aproximadamente 20.000 imóveis, em uma área de 196 Km² (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005). O clima é do tipo tropical úmido, com temperatura média anual de 24 °C, precipitação pluviométrica média anual de 1.310 mm, com um período chuvoso de janeiro a setembro.

Em 2001, Moreno foi incluído entre os 39 municípios prioritários para a intensificação das ações de combate ao *Aedes aegypti* no Estado de Pernambuco. Na epidemia de dengue em 2002, o Coeficiente de Incidência (CI) foi 865/100 mil habitantes (SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMAS DE CONTROLE DE FEBRE AMARELA E DENGUE, 2008b). Aproximadamente 97% dos casos foram notificados no período de janeiro a maio. Os resultados da pesquisa larvária revelaram nesta mesma ocasião um Índice de Infestação Predial (IP) para *A. aegypti* de 0,5% e para *Aedes albopictus* de 0,7% (SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMAS DE CONTROLE DE FEBRE AMARELA E DENGUE, 2008b).

5.3.1.2 Levantamento entomológico preliminar com base na coleta de ovos de *Aedes* spp.

Com o objetivo de conhecer o nível de infestação por *Aedes* spp. dos 15 bairros de Moreno e selecionar as áreas em que seriam implantadas as diferentes estratégias de controle vetorial propostas neste estudo, foi realizado um inquérito entomológico prévio. Para tanto,

ovitrampas modelo Santos *et al.* (2003) foram distribuídas em todos os bairros do município de Moreno, em abril de 2002. Foram instaladas 457 armadilhas (uma ovitrampa/quarteirão) que permaneceram em campo por apenas um ciclo de cinco dias.

Tabela 11 - Níveis de infestação por *Aedes* spp. no município de Moreno-PE, estimado pela coleta de ovos através de armadilhas de oviposição, em um ciclo de cinco dias de coleta, no período de 03 a 08 de abril de 2002.

Bairros	Nº ovitrampas	Nº ovos	IPO(%) ¹	Nº médio de ovos/ovitrampa
Nossa Senhora de Fátima	26	3.177	88,5	122,2
Alto Santo Antônio	49	6.071	71,4	126,5
Cercado Grande	10	423	70,0	42,3
Nossa Senhora de Conceição	44	1.476	68,1	39,9
João Paulo II	48	1.866	67,3	39,7
Parque dos Eucaliptos	18	950	62,5	52,8
Bela Vista	13	429	61,5	35,7
Nossa Senhora das Graças	15	743	60,0	49,5
Liberdade	21	1.031	57,1	49,1
Bonança	78	3.313	52,5	43,6
Alto da Maternidade	50	2.178	48,0	45,4
Cohab	30	814	46,6	27,1
ABC	37	1.224	40,5	33,1
Massaranduba	11	298	36,3	27,1
Centro	07	78	28,5	15,6
Total	457	24.071	59,5	52,7

¹IPO=Índice de Positividade de Ovitampas.

De acordo com os dados obtidos (Tabela 11) foram estabelecidos os seguintes níveis de infestação: alta (100% a 70%), média (69% a 40%) e baixa (39% a 10%) e foi selecionado, através de amostragem por conveniência, um bairro representativo de cada categoria: Nossa Senhora de Fátima (NSF) (alta infestação), Nossa Senhora das Graças (NSG) (média infestação) e Massaranduba (MAS) (baixa infestação), além do bairro controle, Centro (CEN) (Figura 30). A Tabela 12 contém informações complementares sobre os bairros selecionados.

Foram estabelecidas parcerias entre o Departamento de Entomologia/CPqAM a Secretaria Municipal de Saúde/Núcleo de Vigilância Ambiental e a Saúde e as empresas SUMITOMO e BIOTICON, que garantiram a implementação das estratégias descritas a seguir.

5.3.1.3 Estratégias de controle implementadas em Moreno

5.3.1.3.1 Biolarvicidas utilizados

O larvicida organofosforado temefós foi substituído em dezembro de 2002 por produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) para o tratamento de criadouros reais e potenciais do mosquito, em todos os bairros localizados na Sede do Município. Os Produtos, doses e intervalos de aplicação adotados em 12 dos 15 bairros do município foram os recomendados pelo PNCD. Esquemas diferenciados incluindo novos produtos (Figura 32) foram implementados em três bairros pré-selecionado (Tabela 13).

5.3.1.3.2 Caracterização do padrão de oviposição na área domiciliar

Para definir o melhor local, na área domiciliar, para a instalação permanente das ovitrampas, foi realizado um estudo sobre a preferência de oviposição das espécies de *Aedes* de setembro a outubro de 2002, em 124 imóveis reconhecidamente infestados por estes mosquitos. Duas armadilhas foram instaladas simultaneamente, uma no intradomicílio (cozinha) e outra no peridomicílio (quintal ou jardim), onde permaneceram por cinco dias. Após este período as armadilhas foram recolhidas, os ovos contados e as espécies identificadas.

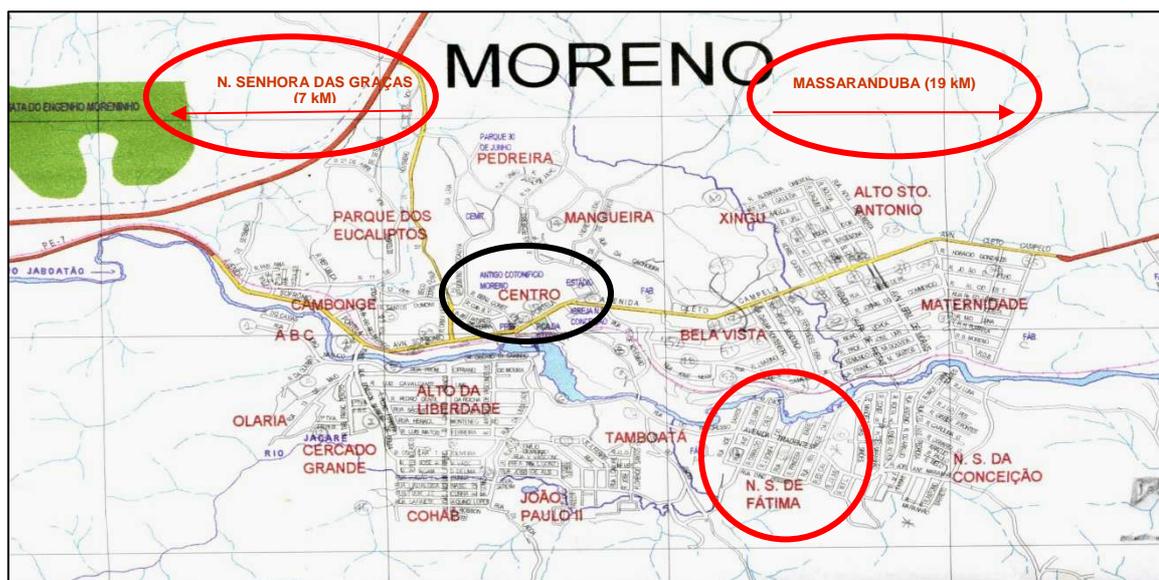


Figura 30- Visualização dos bairros do município de Moreno-PE. Os círculos em vermelho indicam os bairros selecionados para implementação de novas estratégias de controle, e em preto o bairro do Centro adotado como testemunho.
 Fonte: MORENO, (2008).

Tabela 12 - Características da ocupação geográfica e da infestação por *Aedes aegypti* de bairros do município de Moreno, em 2002.

Bairro ¹	Distância do Km 0	Nº imóveis (residenciais)	Fisionomia	Vegetação	IP ¹ 2002 (min-max)
NSF	3 Km	627 (444)	Urbana	Escassa	0 - 2,8%
NSG	7 Km	97 (58)	Perirural	Abundante	0 - 3,1%
MAS	19 Km	263 (175)	Rural	Abundante	0
CEN ²	0 km	406 (153)	Urbana	Escassa	0 - 2,8%

¹NSF=Nossa Senhora de Fátima, NSG=Nossa Senhora das Graças, MAS=Massaranduba, CEN=Centro. ¹Índice de Infestação Predial= % de imóveis com foco do mosquito, estimado a partir da investigação de 1/3 dos imóveis do bairro. ²Bairro controle.

Tabela 13- Produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) utilizados no tratamento de criadouros de *Aedes* spp. no município de Moreno-PE, de dezembro/2002 a abril/2003.

Bairros	Produto (fornecedor)	Formulação	Potência (UTI/mg)	Dose	Frequência de aplicação
NSG ¹	Antilarvi® (BIOTICOM)	comprimido	750	1/50 L	30-70 dias
MAS ²	VectoBac®T (SUMITOMO)	comprimido	2.500	1/50 L	30-70 dias
NSF ³	VectoBac®WDG ⁵ (SUMITOMO)	granulado	3.000	1g/500 L	30-70 dias
CEN ⁴	VectoBac®WDG ⁵	granulado	3.000	1g/500 L	70 dias
	VectoBac®CG ⁶ (SUMITOMO)		200	1g/50 L	70 dias

¹NSG=Nossa Senhora das Graças, ²MAS=Massaranduba, ³NSF=Nossa Senhora de Fátima, ⁴CEN=Centro; ⁵Granulado dispersível em água; ⁶Granulado em matriz de milho.

5.3.1.3.3 Ovitrapas-monitoramento (OVT-MON)

Ovitrapas similares ao modelo descrito por Santos *et al.* (2003), contendo 1L de água potável, tratada com 1,0 g de biolarvicida, foram utilizadas para monitorar a presença e densidade de ovos de *Aedes* spp. Elas foram instaladas na área peridomiciliar de pelo menos 50% dos imóveis residenciais dos bairros de Nossa Senhora das Graças e Massaranduba, em casas alternadas, e em aproximadamente 100% dos imóveis de Nossa Senhora de Fátima, casa a casa. No bairro Centro, 23 armadilhas também foram distribuídas de forma alternada perfazendo os pontos de observação da área controle. O indicador usado para o acompanhamento da flutuação populacional do mosquito foi o número de ovos/ovitrampa/dia, visto que as ovitrapas permaneceram em campo por períodos que variaram de 30 a 70 dias.

5.3.1.3.4 Ovitrapas-controle (OVT-C)

As ovitrapas-monitoramento também foram utilizadas como instrumento de controle, com o objetivo de remover e eliminar ovos de *Aedes* spp. que seriam depositados no

ambiente, atuando assim de forma complementar às ações de eliminação e tratamento larvicida de criadouros do mosquito na área domiciliar.

5.3.1.3.5 Ações de monitoramento e controle por armadilhas de oviposição:

Todas as ações descritas a seguir foram implementadas no município a partir de dezembro de 2002

- A) Utilização de índices entomológicos baseados na presença e quantidade de ovos nas ovitrampas-monitoramento e na pesquisa larvária para o acompanhamento da infestação por *Aedes* spp., na área de estudo;
- B) Coleta massiva de ovos de *Aedes* através de ovitrampas-controle em ciclos com duração mínima de 20 dias e máxima de 50 dias, durante os meses de dezembro/2002, janeiro e fevereiro/2003. O mesmo intervalo de tempo foi considerado para a troca de palhetas e reposição da infusão de gramíneas e do Bti;
- C) Uso de ovitrampas-controle em casas alternadas (01 ovitrampa/imóvel) nos bairros de Massaranduba e Nossa Senhora das Graças;
- D) Uso massivo de ovitrampas-controle instaladas casa a casa (01 ovitrampa/casa) em Nossa Senhora de Fátima, por um período de 90 dias (dezembro/2002 a fevereiro/2003) e 02 ovitrampas/casa por um período de quatro anos e dois meses (março/2003 a maio/2007). Intervalos de 20 a 70 dias foram considerados para a troca de palhetas e reposição da infusão de gramíneas e do Bti;
- E) O monitoramento populacional do mosquito no bairro de Nossa Senhora de Fátima passou a ser feito através de 100 ovitrampas-sentinelas, em ciclos de 28 dias (REGIS *et al.*, 2008), de abril de 2004 a maio de 2007.

As ações supracitadas foram realizadas pela equipe de campo do município, composta por 17 Agentes de Saúde e um Supervisor, todos engajados na rotina do PNCD. Além desta, a equipe de campo do Depto de Entomologia/CPqAM, que reúne seis técnicos, participou ativamente do processo de recolhimento e transporte das palhetas do campo para o laboratório.

Informações do SISFAD quanto aos tipos de reservatórios de água mais frequentes no município foram utilizadas para estimar o consumo de biolarvicidas, em função do número de tratamentos programados. De acordo com tais informações os tonéis de plástico e de ferro com capacidade para 200 L e os tanques e caixas d'água de 500 L correspondem a mais de 70% dos criadouros potenciais para formas jovens do mosquito (Figura 31).



Figura 31 - Tipos de reservatórios de água mais frequentes no município de Moreno-PE, comumente encontrados positivos para larvas e pupas de *Aedes* spp.

Nota: (A) tanque em amianto; (B) tonel em ferro; (C) tonel em plástico; (D) caixa d'água.

Fonte: Melo-Santos, 2000b.

5.3.2 Resultados

Os resultados do estudo inicial quanto ao local de preferência para oviposição revelaram que 76% das ovitrampas instaladas no peri domicílio estavam positivas, diferindo significativamente ($p < 0,0001$) do percentual (24%) observado no intra domicílio. Da mesma forma, uma maioria significativa (73%) ($p < 0,0001$) dos 7.000 ovos foi coletada nas ovitrampas da área peridomiciliar, 67% dos quais eram de *Ae. aegypti*. O padrão de preferência foi diferente para *Ae. albopictus*, que colonizou de forma indistinta as armadilhas do peri (48,3%) e do intradomicílio (51,7%). Com base nestes dados as ovitrampas para monitoramento e controle foram instaladas exclusivamente na área peridomiciliar.

A pré-análise da infestação nos 15 bairros de Moreno, em abril de 2002, revelou a presença de fêmeas de *Aedes* spp. em fase reprodutiva em todos os bairros, em aproximadamente 60% dos 457 imóveis investigados. O IPO nos bairros variou de 28,5% a

88,5% e a densidade de 15,6 a 126,5 ovos/ovitrampa/semana (Tabela 11). Uma baixa associação entre estes índices foi caracterizada para os bairros de Moreno.

A Tabela 14 resume a quantidade de imóveis vistoriados e de reservatórios de água tratados com os biolarvicidas, ação de controle integrada ao uso de OVT-C nas áreas. O primeiro tratamento foi realizado ao término do primeiro ciclo de coleta de ovos, ou seja, no fim do período de pré-intervenção (tempo 0) (Tabela 15).

Os resultados a partir da pesquisa larvária foram, com freqüência, negativos para a presença de *A. aegypti* e *A. albopictus* nos bairros estudados, inclusive no período de pré-intervenção, quando todos os bairros aparecem com IP=0 para *A. aegypti* (Tabela 15). Os maiores valores de IP para *A. aegypti* durante o estudo foram 3,1% e 6,2% e para *A. albopictus*, 21,6% e 10,3% registrados em MAS e NSG, respectivamente (Tabela 15). Os indicadores entomológicos baseados na presença e quantidade de ovos mostraram que *Aedes* spp estava em todos os bairros, em todos os momentos investigados (Tabela 15).

Aspectos operacionais impossibilitaram a coleta de dados no Centro (bairro testemunha) no mesmo período pré intervenção das áreas tratadas, entretanto as observações seguintes mostram aumento gradual do percentual de ovitrampas positivas de janeiro a junho de 2003, exceto em Massaranduba onde foi registrada a redução do IPO no 2º ciclo de coleta de ovos, em fevereiro de 2003 (Tabela 15).

Tabela 14 – Quantidade de reservatórios de água tratados com diferentes produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) em três bairros do município de Moreno, ao longo de três ciclos de aplicação dos biolarvicidas, no período de dezembro/2002 a abril/2003.

Bairro	Nº de imóveis (residencial)	Total de reservatórios
Nossa Senhora de Fátima	627 (444)	1.768
Massaranduba	263 (175)	488
Nossa Senhora das Graças	97 (58)	168

A análise da variação temporal da densidade de ovos demonstra uma diminuição progressiva até o 2º ciclo de intervenção em todos os bairros tratados, seguido de um aumento nos ciclos subsequentes, 3º e 4º ciclo (junho/2003) (Tabela 15; Figura 32). O declínio mais acentuado e significativo ($p < 0,000$) do número médio de ovos foi verificado entre o período de pré-intervenção e o 2º ciclo de coleta de ovos (Tabela 15; Figura 32). Nos ciclos seguintes foi registrada uma discreta elevação da densidade de ovos, que coincidiu com o maior intervalo (>60 dias) entre as aplicações dos biolarvicidas. Os valores nestes momentos foram estatisticamente menores ($p = 0,001$) do que os valores obtidos no período de pré intervenção ou similares aos do 1º ciclo de coleta massiva de ovos. Na área testemunha (Centro) a densidade de ovos foi duas vezes maior no 4º ciclo do que no 1º (Tabela 15; Figura 32), e de um modo geral, crescente ao longo dos quatro ciclos analisados.

Nos sete meses de uso das ovitrampas-controle em Moreno foram coletados cerca de 318.000 ovos em 1.911 palhetas. Uma grande variação do número máximo de ovos coletado por ovitrampa foi observado entre as localidades. O maior valor foi encontrado em NSF (2.009 ovos/ovitrampa) seguido de NSG (919 ovos/ovitrampa) e MAS (629 ovos/ovitrampa).

A primeira avaliação do uso prolongado das ovitrampas-controle em NSF revelou uma redução acentuada no número de ovos/ovitrampa/dia quando se compara dezembro de 2002 (pré-intervenção) com dezembro de 2003 e 2004 (Figura 33). Estes dados foram obtidos da contagem direta de ovos nas ovitrampas-controle.

O monitoramento populacional contínuo com 100 ovitrampas-sentinelas (OVT-S) a partir de abril/2004 permitiu avaliar o impacto desta intervenção até maio de 2007. Os dados mostram flutuação sazonal da densidade da população reprodutivamente ativa do *Aedes* (Figura 34), com densidades de ovos estatisticamente maiores ($p < 0,001$) no período de chuvas do que no período seco. A análise temporal mostrou ainda uma clara tendência ($p = 0,008$) de diminuição progressiva da densidade de ovos ao longo do tempo (Figura 35).

A identificação de 1.773 larvas no período de dezembro/2002 a abril/2003 mostrou que *A. aegypti* e *A. albopictus* ocorriam na área estudo, com predominância de *A. aegypti* (75%) em NSF e de *A. albopictus* em NSG e MAS. Nestes dois últimos bairros, menos de 1% das larvas identificadas eram de *A. aegypti*.

Tabela 15- Parâmetros entomológicos inferidos para bairros do município de Moreno-PE, através da pesquisa por ovitrampa e larvária durante as intervenções para controle do *Aedes aegypti*, no período de dezembro de 2002 a junho de 2003.

Áreas /Parâmetros	Períodos de Intervenção					Total
	Pré (dez/02)	1º (jan/03)	2º (fev/03)	3º (abr/03)	4º (jun/03)	
Nossa Sra. Fátima (NSF)						
Duração do ciclo de coleta de ovos (dias)	20	28	44	70	55	217
Nº Ovitrampas (IPO ¹)	284 (75,0%)	203 (79,0%)	186 (92,0%)	477 (94,5%)	502 (96,4%)	1.652 ¹
Total de ovos	38.996	26.315	20.269	69.653	112.877	268.110
Nº ovos/Ovitampa/dia	6,9	4,6	2,5	2,1	4,1	0,7
IP ² <i>A. Aegypti</i>	0,0	0,3	0,0	0,7	2,2	NA
IP <i>A. Albopictus</i>	0,4	0,0	0,4	0,3	2,2	NA
Intervalo entre tratamentos dos criadouros (dias)	0	31	31	68	60	NA
Nossa Sra. das Graças (NSG)						
Duração do ciclo de coleta de ovos (dias)	21	18	28	67	57	191
Nº Ovitrampas (IPO)	37 (89,2%)	33 (72,7%)	31 (83,4%)	41 (97,6%)	41 (100%)	183
Total de ovos	4.799	2.114	1.281	10.316	7.778	26.288
Nº ovos/Ovitampa/dia	6,2	3,6	1,5	3,7	3,3	0,7
IP <i>A. Aegypti</i>	0,0	0,0	6,2	0,0	-	NA
IP <i>A. Albopictus</i>	3,6	0,0	0,0	10,3	-	NA
Intervalo entre tratamentos dos criadouros (dias)	0	37	40	61	58	NA
Massaranduba (MAS)						
Duração do ciclo de coleta de ovos (dias)	20	21	32	42	73	189
Nº Ovitrampas (IPO)	80 (71,3%)	70 (74,3%)	69 (48,0%)	66 (83,3%)	66 (83,3%)	351
Total de ovos	3.356	4.415	2.587	6.285	7.514	24.157
Nº ovos/Ovitampa/dia	4,7	3,0	1,2	2,3	1,5	0,4
IP <i>A. Aegypti</i>	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	NA
IP <i>A. Albopictus</i>	0,0	0,0	0,0	13,6	21,6	NA
Intervalo entre tratamentos dos criadouros (dias)	0	31	41	86	68	NA
Centro (CEN)– área testemunha³						
Duração do ciclo de coleta de ovos (dias)	-	24	40	40	52	NA
Nº Ovitrampas ⁴ (IPO)	-	18 (72,0%)	23 (78,0%)	22 (82,6%)	23 (86,0%)	NA
Total de ovos	-	726	1.887	2.565	3.826	NA
Nº ovos/Ovitampa/dia	-	1,7	3,4	2,9	3,3	NA
IP <i>A. Aegypti</i>	0,0	-	0,0	0,8	-	NA
IP <i>A. albopictus</i>	0,0	-	0,0	2,48	-	NA
Intervalo entre tratamentos dos criadouros	-	70	-	68	-	NA

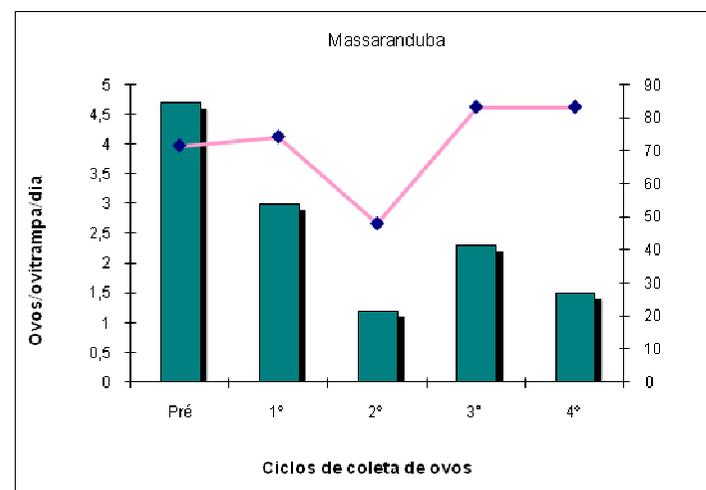
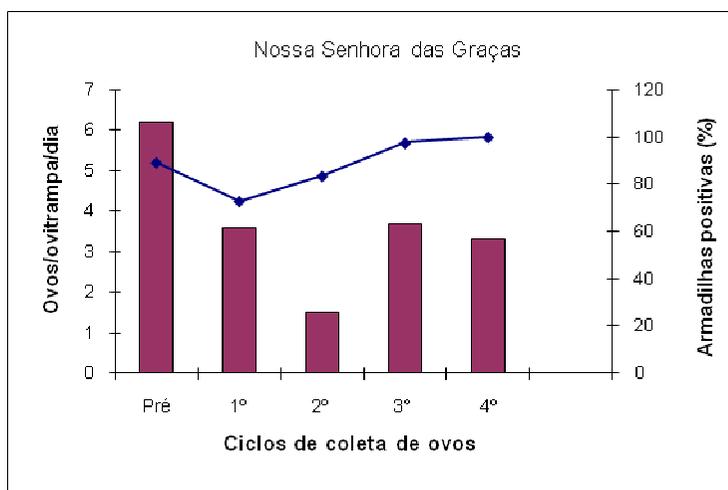
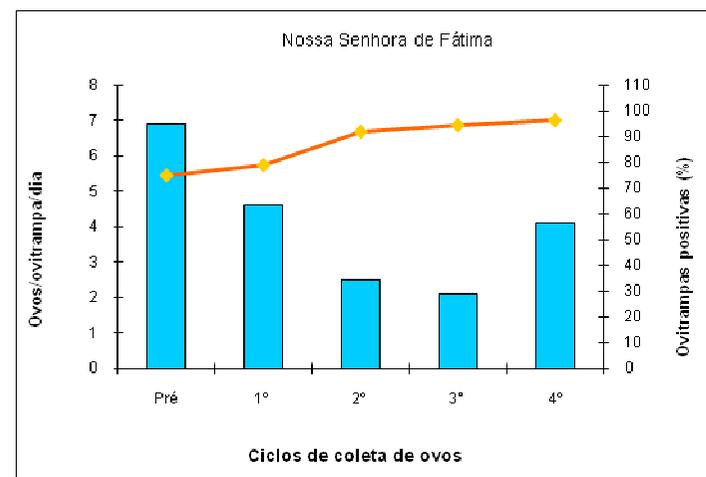
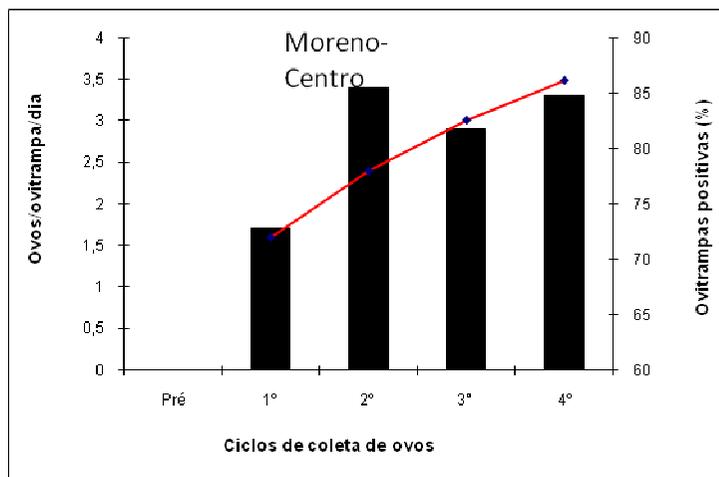


Figura 32- Densidade de ovos de *Aedes* spp. observada em bairros do município de Moreno-PE nos momentos de implementação de ovitrampas para o controle complementar do mosquito associada ao uso do Bti em criadouros, representados pelos ciclos de: pré intervenção (dez/2002), intervenção 1° (dez/02-jan/03), 2° (jan-fev/03), 3° (mar-abr/03) e pós intervenção (mai-jun/03). As barras representam o número médio de ovos/ovitrampa/dia e as linhas o percentual de ovitrampas positivas.

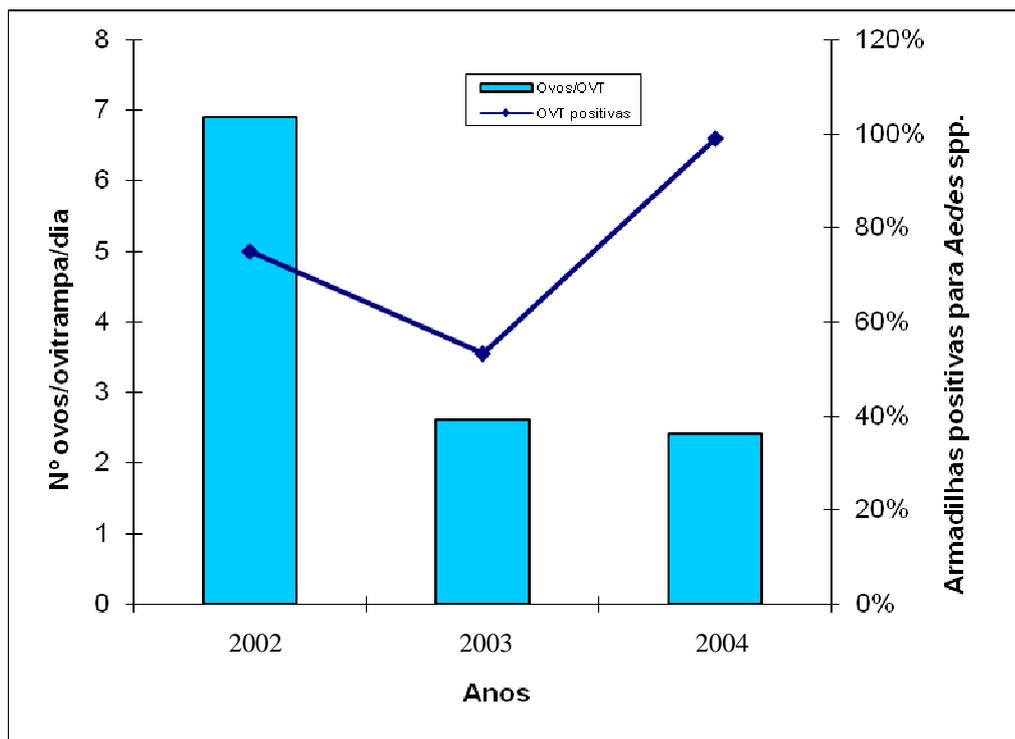


Figura 33 - Índice de infestação por *Aedes* spp obtido através da coleta de ovos do mosquito, em dezembro de 2002 a 2004, no bairro de Nossa Senhora de Fátima, Moreno-PE, durante o uso contínuo de ovitampas-controle, a partir de janeiro/2003, integrado às demais ações de controle vetorial.

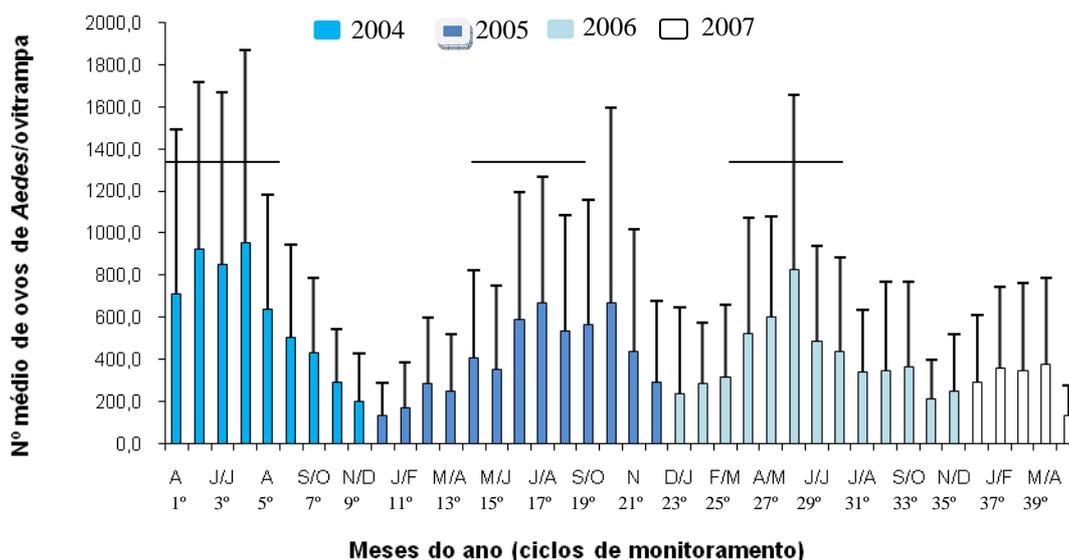


Figura 34 - Variação longitudinal/sazonal do número médio de ovos de *Aedes* spp observada no bairro de Nossa Senhora de Fátima, Moreno-PE, durante o uso ininterrupto de ovitampas-controle, a partir de janeiro/2003, integrado às demais ações de controle vetorial. Os dados de monitoramento referem-se a 40 ciclos de coleta realizados de abril de 2004 a maio de 2007. As linhas horizontais indicam o período de chuvas mais intensas, de abril a agosto de cada ano.

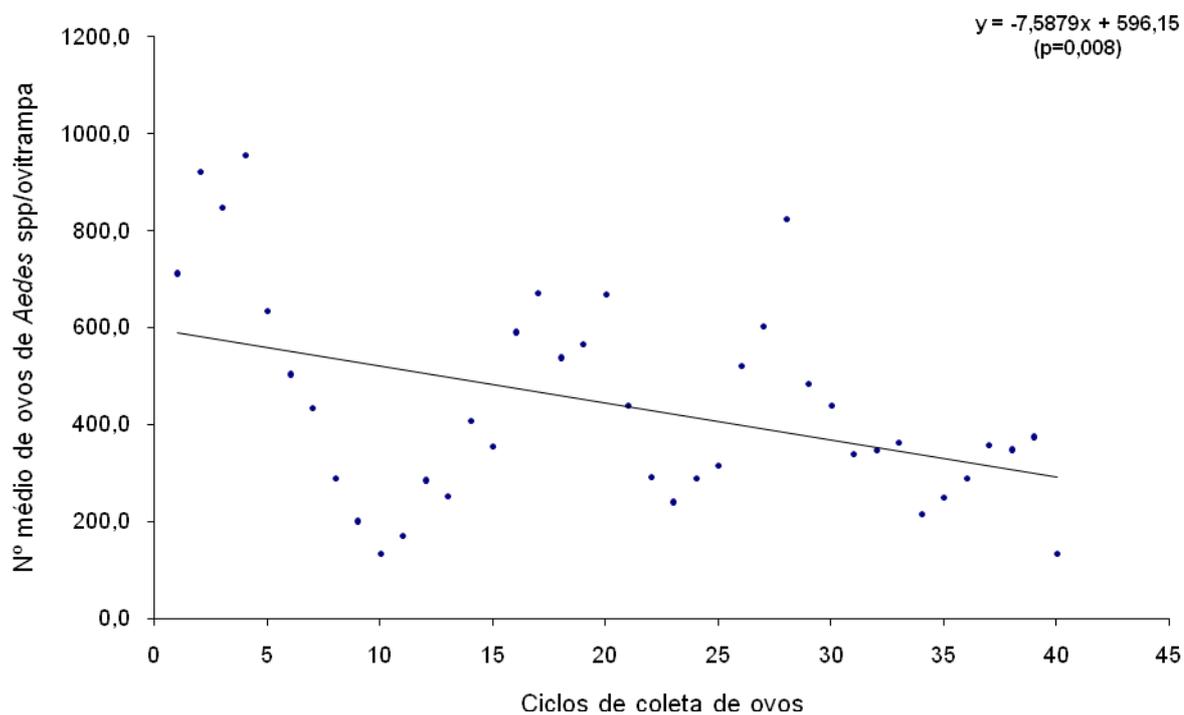


Figura 35 - Variação do número médio de ovos de *Aedes* spp observada para o bairro de Nossa Senhora de Fátima, Moreno-PE, durante o uso ininterrupto de ovitrampas-controle, a partir de janeiro/2003, integrado às demais ações de controle vetorial. Os dados de monitoramento referem-se a 40 ciclos de coleta realizados de abril de 2004 a maio de 2007. A linha de regressão linear mostra tendência a diminuição significativa ($p=0,008$) da densidade populacional ao longo de tempo.

5.4 Estudo V: Estratégias para o controle integrado de *Aedes* spp. implementadas em bairros do Recife-PE

5.4.1 Procedimentos Metodológicos

5.4.1.1 Caracterização da área

Este estudo foi realizado em duas áreas com características distintas, a primeira compreendendo os bairros de Casa Forte e Parnamirim (CFP), com área de 1,17 km², densidade populacional de 21.386 habitantes/km², com fisionomia urbana predominantemente verticalizada, com presença expressiva de prédios altos e casas geralmente com grandes áreas peridomiciliares arborizadas, assim como parques, praças e terrenos baldios com vegetação. A segunda área representada pelo bairro do Engenho do Meio (EM), com 0,89 km² e densidade de 11.865 habitantes/km², em sua maioria vivendo em imóveis do tipo casa, com áreas peridomiciliares grandes, porém pouco arborizadas, presença esparsa de áreas verdes como praças e terrenos baldios. Brasília Teimosa (BT) com 0,62 km² e 30.895 habitantes/km², utilizada neste estudo como área controle, é um bairro situado à beira-mar, caracterizado por imóveis do tipo casa, geralmente com áreas peridomiciliares reduzidas ou mesmo inexistentes e escassez de vegetação (Figura 36, 37). De acordo com critérios epidemiológicos, sócio-econômicos, ambientais e de ocupação territorial descritos em Regis *et al.* (2008) (Apêndice 3), CFP está inserido no estrato de elevada qualidade de vida e baixo risco para transmissão de doenças como a dengue, enquanto que EM, mostra-se mais heterogêneo, classificado em estratos intermediários para estes parâmetros.

Segundo levantamento por ovitrampa realizado em estudos anteriores, estes bairros têm em comum a elevada infestação por *Aedes* spp. com predominância de *A.aegypti*, cujo percentual varia de 87,1% em CFP, 99,4% em EM a 99,9% em BT (NAKAZAWA, 2006; REGIS *et al.*, 2008).

5.4.1.2 Estratégias de controle implementadas em Recife

Duas estratégias de controle baseadas no uso de um grande número de armadilhas de oviposição foram testadas em áreas do Recife também submetidas às ações de controle realizadas pelo PNCD. O objetivo foi verificar o impacto conjunto das ações sobre a densidade populacional de *Aedes* spp. nas áreas, através do monitoramento por armadilhas de oviposição.



Figura 36- Distribuição espacial dos bairros do Recife. Em destaque as áreas de Casa Forte/Parnamirim (CFP), Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa (BT), onde foi realizado o experimento, no período de dezembro de 2004 a dezembro de 2006.

Fonte: Acioli, (2007); Regis *et al.* (2008).

5.4.1.2.1 Ovitrapa-controle (OVT-C)

Ovitrapas-controle (OVT-C) modelo descrito por Regis *et al.* (2008) e Lenhart *et al.* (2005), já referidas no item 3.1 da 1ª parte, foram utilizadas nas estratégias testadas no Recife.

As OVT-C diferiram das utilizadas em Moreno nos seguintes aspectos: vasos com capacidade para 2,5L, contendo 2L de infusão de gramínea a 10%, tratados com 4,0 g de biolarvicida, três palhetas de eucatex (5,0 x 13 cm) (Figura 6B), ou revestidas internamente por tecido em algodão cru (17,0 cm x 58,0 cm) (Figura 6C). As ovitrampas permaneceram em campo por períodos de seis meses ou de um ano, com renovação da infusão, do Bti e das palhetas ou tecidos, a cada dois meses. As palhetas ou tecidos recolhidos eram incinerados. Quando extraviadas as ovitrampas eram substituídas por novas.

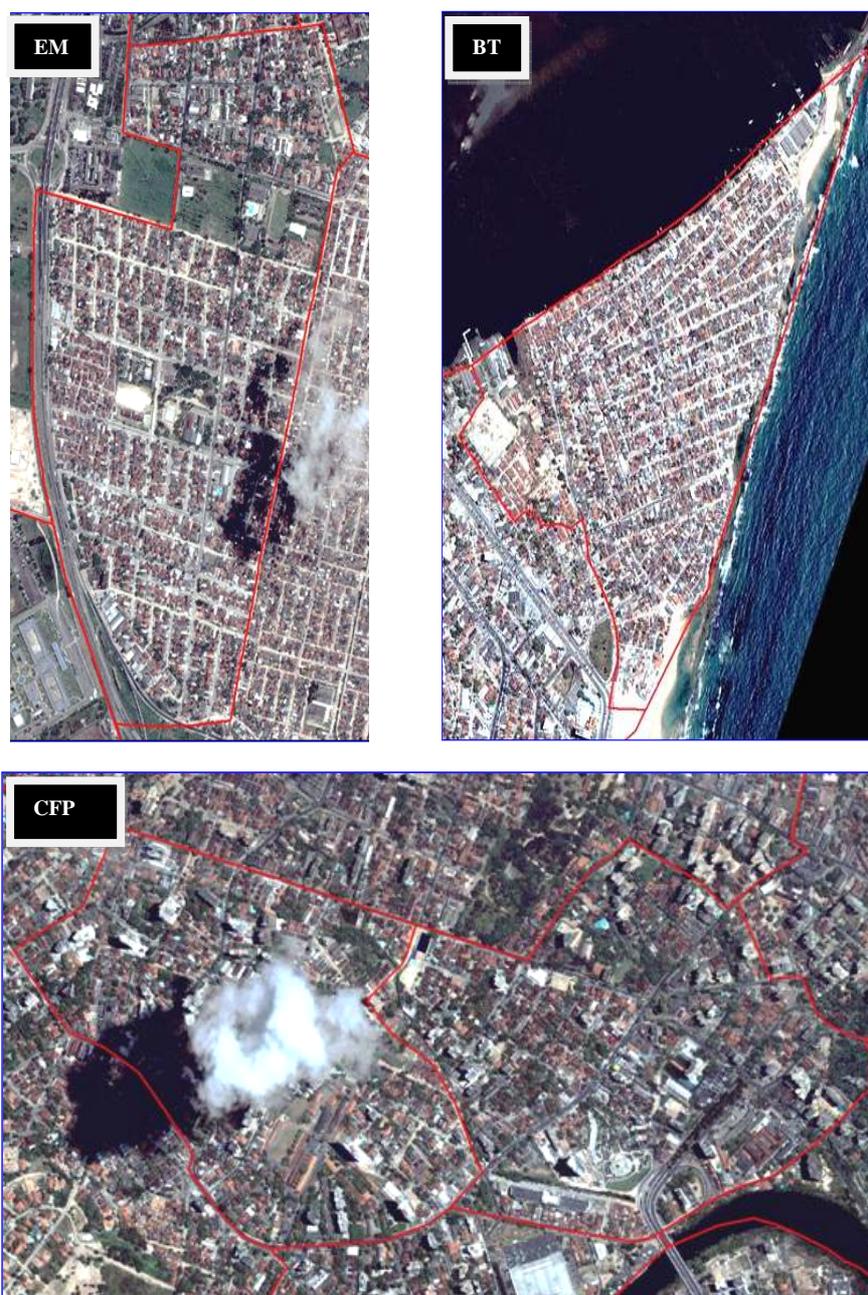


Figura 37 - Imagem de satélite de bairros da Região Metropolitana do Recife-PE.
Nota: (EM) Engenho do Meio, (BT) Brasília Teimosa, (CFP) Casa Forte/Parnamirim.
Fonte: Acioli, (2007).

5.4.1.2.2 Esquemas de distribuição das OVT-C

A instalação das armadilhas foi precedida pela divulgação de informações à população local sobre os objetivos e métodos do estudo, através de carro de som e filipetas explicativas (REGIS *et al.*, 2008). Esta ação, realizada pelo Programa de Saúde Ambiental da Secretaria de Saúde do Recife (PSA/SMS-Recife), teve por objetivo garantir a adesão e a permissão para a instalação das ovitrampas no maior número de imóveis, bem como esclarecer à comunidade sobre a participação, na operação, de uma equipe de aproximadamente 30 soldados do Exército, previamente capacitados em oficinas.

Primeira Intervenção de controle (IC-I): realizada no período de dezembro de 2004 a abril de 2005 (seis meses), abrangeu todo o bairro do Engenho do Meio (EM) e a área de Casa Forte/Parnamirim (CFP). A meta foi a instalação de duas OVT-C/imóvel, na área peridomiciliar de casas ou no pavimento térreo dos prédios.

Segunda Intervenção de controle (IC-II): realizada de dezembro de 2005 a novembro de 2006, abrangeu apenas a metade sul do bairro de EM. Nesta ocasião, o número de ovitrampas/imóvel variou de duas a, no máximo, 20, em função do tipo e extensão do imóvel. Os imóveis foram classificados em: residencial (casa), grande porte (igrejas, escolas, associações e outros com áreas extensas) e ponto estratégico, segundo caracterização do PNCD. Com a intenção de minimizar o efeito da migração de mosquitos da parte norte, para a parte sul, os imóveis de “fronteira”, aqueles localizados próximos a linha divisória entre as duas partes, receberam até quatro OVT-C.

É importante mencionar que o processo de instalação inundativa das OVT-C contou com uma equipe de aproximadamente 40 Agentes de Saúde Ambiental (ASA), da Prefeitura do Recife, distribuídos nos bairros destacados na figura 36. Esta atividade não modificou a rotina de ações de controle do PNCD, relacionadas a eliminação e tratamento dos criadouros do mosquito, com os produtos VectoBac[®]CG e VectoBac[®]WDG.

5.4.1.3 Avaliação das estratégias de controle através do monitoramento por ovitrampas-sentinelas (OVT-S)

As informações sobre a distribuição e densidade populacional de *Aedes* spp. nas áreas tratadas foram obtidas a partir de dados do Projeto “Sistema de Apoio Unificado para a Detecção e Acompanhamento em Vigilância Epidemiológica (SAUDAVEL)”. Estes dados foram colhidos por um sistema de monitoramento contínuo, através de 80, 100 e 100 ovitrampas-sentinelas (OVT-S) georreferenciadas (Figura 38), instaladas nos bairros de BT, EM e CFP, respectivamente, de abril de 2004 a maio de 2007.

As ovitrampas-sentinelas, modelo descrito em Regis *et al.* (2008), utilizadas para a coleta sistemática de ovos de *Aedes* spp. apresentaram as seguintes modificações comparadas a OVT-C: tempo de permanência em campo de 28 dias e adição de 2,0 g de larvicida biológico, granulado, à base de Bti. As palhetas retiradas a cada ciclo (28 dias) eram enviadas ao laboratório para contagem dos ovos e substituídas por novas. Informações quanto ao número de ovos recolhidos, frequência e abundância das espécies de *Aedes* presentes nas OVT-S foram registradas em um Banco de Dados geográficos da Rede SAUDAVEL (<http://saudavel.dpi.inpe.br>), no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), e disponibilizadas para análises neste estudo (ACIOLI, 2007; NAKAZAWA, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2007; REGIS *et al.*, 2008).

Alguns aspectos particulares e descritivos do método como: aceitação da ferramenta pela comunidade, integridade da armadilha, quantidade de palhetas e/ou tecidos incinerados, percentual de ovitrampas secas e quantidade real de ovos foram inferidos a partir de uma amostra de aproximadamente 3% dos imóveis que receberam as OVT-C, instaladas no primeiro momento de intervenção (IC-I), realizado de dezembro/2004 a abril/2005. No segundo momento, (IC-II), que ocorreu de dezembro/2005 a novembro/2006, apenas alguns destes aspectos foram reavaliados.

Para avaliar o impacto das ações de controle sobre o nível de infestação das áreas, o número médio de ovos foi calculado considerando diferentes períodos, cada um compreendendo um número variável de ciclos de coleta de ovos. De acordo com os momentos de intervenção referidos no item 3.4.1.2, foram estabelecidos os seguintes períodos:

Monitoramento IC-I: pré intervenção de abril a novembro de 2004 (1° ao 8° ciclo); intervenção de dezembro/2004 a abril/2005 (9° ao 13°) e pós intervenção de maio a novembro de 2005 (14° ao 21°).

Monitoramento IC-II: pré intervenção de maio a novembro de 2005 (14° ao 21° ciclo), intervenção de dezembro/2005 a dezembro/2006 (22° ao 35°) e pós intervenção de janeiro a abril de 2007 (36° ao 40°).

Da mesma forma, para avaliar o efeito da variação pluviométrica sobre a densidade de ovos de *Aedes* spp. foram considerados três períodos: a) transição, compreendido de janeiro a abril, caracterizado por chuvas esparsas e intensas; b) chuvoso, de maio a agosto, com chuvas intensas e freqüentes e c) seco, de setembro a dezembro, com chuvas raras.

5.4.1.4 Análise estatística:

Para análise comparativa das variáveis quantitativas, foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA). Para testar os contrastes, foi aplicado o teste de Levene para verificar a suposição de homogeneidade das variâncias, e em seguida o teste de Tukey ou de Tamhane. Todas as conclusões foram tomadas com significância de 5%. A análise espacial foi feita a partir da associação dos dados geográficos e o número de ovos em cada área através do estimador de densidade Kernel, que a partir das informações das 80 ou 100 OVT-S é capaz de estimar a infestação para a área como um todo, gerando mapas situacionais onde podem ser evidenciados os “hot spot” pontos mais críticos da infestação. Esta análise foi feita usando o programa livre TerraView (www.dpi.inpe.br/terraview) (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Um total de 3.685 OVT-C (4.140 armadilhas/km²) foi instalado em Engenho do Meio (EM) e 1.917 (1.638 armadilhas/Km²) em Casa Forte e Parnamirim (CFP), no IC-I (dezembro de 2004 a maio de 2005). Mais de 3.000 imóveis foram visitados nas duas áreas. Os percentuais de recusa à instalação da armadilha foram de 3,8% em EM e 9,0% em CFP.

A análise de uma amostra de 160 imóveis com OVT-C mostrou que cerca de 5% delas foram extraviadas, em cada ciclo de 60 dias. Após o primeiro ciclo de coleta massiva de ovos,

de dezembro/04 a janeiro/05 (período mais seco), observou-se uma elevada porcentagem de ovitrampas secas nas duas áreas, EM (87%) e CFP (44%), entretanto, a maioria das palhetas se apresentava úmida ao ser retirada da armadilha, o que sugere que estavam ainda funcionais ao final dos 60 dias em campo. Nos ciclos seguintes, o percentual de ovitrampas secas foi inferior a 10% nas duas áreas.



Figura 38 – Visualização dos pontos onde foram instaladas 100 armadilhas de oviposição para o monitoramento populacional de *Aedes* spp. no bairro Engenho do Meio, Recife/PE.

Fonte: Acioli, (2007).

5.4.2 Resultados

O índice de positividade das OVT-S (IPO) se manteve superior a 95% nos dois bairros estudados. Aproximadamente 60% das armadilhas coletaram mais do que 200 ovos de *Aedes* spp por ciclo de 60 dias (Tabela 16).

Estimativas feitas a partir das OVT-S indicaram que as armadilhas coletaram em média 880,3 ovos/ovitrampa em EM e 980,2 ovos/ovitrampa em CFP, ao longo dos seis meses de sua permanência em campo. Extrapolações feitas com base nestes dados sugerem

que cerca de 8.000.000 ovos podem ter sido removidos em EM e 5.000.000 ovos em CFP, no período estudado (Tabelas 17 e 18).

A comparação do número médio de ovos coletados nas OVT-S mostrou densidades similares nos três bairros no período pré-intervenção (Tabela 19). Os valores foram significativamente menores em EM ($p < 0,001$) e CFP ($p = 0,03$) após a instalação inundativa das OVT-C (Tabela 19).

A flutuação populacional de *Aedes* spp. observada em BT, área não submetida a intervenção com OVT-C, indica que ocorre anualmente um crescimento populacional que tem início em janeiro, atingindo seu ápice de junho a agosto, seguido de uma diminuição progressiva até dezembro (Figura 39).

Durante a utilização das OVT-C no IC-I (dez/04 a abr/05) a densidade de ovos em EM permaneceu, até abril, abaixo da média calculada para o bairro (Figura 40). Em CFP, onde uma concentração menor de OVT-C foi utilizada, a densidade de ovos sofreu uma redução significativa ($p < 0,001$) quando comparada a BT (área sem intervenção), mas os valores, na maioria das vezes, permaneceram acima da média estimada para a área e foram estatisticamente maiores ($p < 0,001$) do que os observados em EM (Figura 40). A diminuição no nível de infestação dos bairros tratados, EM e CFP, ao término do período de intervenção (abril/05) também foi constatada em termos de distribuição espacial, de acordo com a densidade Kernel, que evidenciou a eliminação de zonas de elevada infestação nas duas áreas, sobretudo em EM (Figura 41). A remoção massiva de ovos de *Aedes* spp. parece ter repercutido mesmo quando as OVT-C já não estavam em campo, haja vista que as médias do período pós intervenção para EM e CFP também foram significativamente menores ($P < 0,001$) do que as de BT (Tabela 19; Figura 41).

Na IC-II (dez/2005-nov/2006) foram instaladas pouco mais de 2.700 OVT-C em aproximadamente 1.000 imóveis, localizados na parte sul de EM. O percentual de recusa à instalação das OVT-C, nesta ocasião variou de 1,8% a 5,0% (Tabela 20), e não diferiu do observado na IC-I. Da mesma forma, a perda de OVT-C nos dois momentos de intervenção também foi similar, e totalizou 3,7% para a IC-I e 4,2% para a IC-II.

Na Tabela 21 são mostradas estimativas da quantidade de ovos provavelmente removidos pelas OVT-C em cada ciclo de 60 dias e no período acumulado de um ano. A média geral de ovos coletados nas OVT-S neste momento foi estatisticamente maior ($P = 0,02$) ($1.141,7 \pm 1.213,7$) do que a observada na IC-I ($841,6 \pm 1.188,1$) (Tabelas 19 e 22). As extrapolações com base nestes dados sugerem que mais de 18.000.000 de ovos tenham sido incinerados, neste período (Tabela 21).

Tabela 16. Parâmetros utilizados para avaliação de uma amostra das ovitrampas-controle no processo de coleta de ovos de *Aedes* spp. nos bairros de Engenho do Meio (EM), Casa Forte e Parnamirim (CFP), Recife-PE, no período de dezembro de 2004 a abril de 2005.

Áreas	Nº ovitrampas	IPO ¹ (%)	Ovitrampas-controle com ovos de <i>Aedes</i>		
			Número de ovos		
			< 50	50 ≤ 200	>200
EM	203	203 (95,7%)	17 (8,4%)	61 (30%)	125 (61,6%)
CFP	128	127 (99,2%)	11 (8,7%)	23 (18,1%)	93 (73,2%)
Total	331	330	28 (8,5%)	84 (25,5%)	218 (66,0%)

¹ Índice de positividade de ovitrampas.

Tabela 17 – Estimativa do número de ovos de *Aedes* spp. potencialmente removidos do bairro do Engenho do Meio durante a coleta massiva de ovos, com ovitrampas-controle, no período de dez/2004 a maio/2005.

Ciclos de coleta massiva de ovos	Ovitrampas-Sentinelas			Ovitrampas-controle	
	Nº ¹	Ovos/ciclo	Nº médio ovos	Nº	Nº estimado de ovos
Dez-04/ Jan-05	170	49.417	290,7	3.671	1.067.159,7
Fev/Mar/05	167	59.756	357,8	3.493	1.249.795,4
Abr/ Mai/05	172	338.895	1.970,3	3.332	6.565.039,6
Total	509	448.068	880,3		8.881.994,4

¹Número de ovitrampas.

Tabela 18 – Estimativa do número de ovos de *Aedes* spp. potencialmente removidos dos bairros de Casa Forte/Parnamirim durante a coleta massiva de ovos, com ovitrampas-controle, no período de dez/2004 a maio/2005.

Ciclos de coleta massiva de ovos	Ovitrampas-Sentinelas			Ovitrampas-controle	
	N ^{o1}	Ovos/ciclo	N ^o médio ovos	N ^o	N ^o estimado de ovos
Dez-04/ Jan-05	169	118.789	702,9	1.914	1.345.350,6
Fev/Mar/05	167	175.291	1.049,6	1.755	1.842.048,0
Abr/ Mai/05	170	201.887	1.187,6	1.616	1.919.161,6
Total	506	495.967	980,2		5.106.560,2

¹Número de ovitrampas.

A comparação da evolução temporal da infestação nos bairros de BT e EM, em 2006, revela que a presença das OVT-C restrita à parte sul do bairro, não evitou o crescimento populacional de *Aedes* spp esperado para os meses de junho a agosto (Figura 39). O número médio de ovos coletados nas OVT-S em EM-S não diferiu estatisticamente de EM-N nos diferentes períodos da intervenção (Tabela 22).

Tabela 19 – Número médio de ovos coletados em ovitrampas-sentinelas (OVT-S) instaladas nos bairros de Engenho do Meio (EM) e Casa Forte/Parnamirim (CFP) durante a utilização de ovitrampas-controle (OVT-C) para a coleta massiva de ovos de *Aedes* spp, no primeiro período de intervenção (IC-I), de dez/2004 a abril/2005. O bairro de Brasília Teimosa (BT) não recebeu OVT-C e foi utilizado como testemunha.

Período	Bairros	N ^o OVT-S	N ^o médio de ovos/OVT-S (± DP)	Valor p
Pré-intervenção	CFP	754	896,6 (± 956,3)	0,90
	EM	869	826,9 (± 673,7)	0,09
	BT ³	629	891,9 (± 771,7)	
Intervenção	CFP	584	933,2 (± 964,2)	0,002
	EM	593	841,6 (± 1.188,1)	< 0,001
	BT	538	1.129,7 (± 1.105,4)	
Pós-intervenção	CFP	990	772,8 (± 703,2)	< 0,001
	EM	496	1.350,2 (± 1.316,2)	< 0,001
	BT	436	2.050,1 (± 1.794,2)	

Tabela 20 - Parâmetros utilizados para avaliação da aceitação da instalação das ovitrampas-controle para coleta de ovos de *Aedes* spp. pelos habitantes do bairro de Engenho do Meio (EM), Recife-PE, no período de dezembro de 2005 a dezembro de 2006.

Ciclos de coleta massiva de ovos (Período)	Nº de imóveis visitados	Recusas¹ (%)	Nº armadilhas instaladas	Nº palhetas incineradas	Nº de tecidos incinerados
1º (28/11/05 a 30/01/06)	1.167	2,9	2.700	5.157	-
2º (30/01 a 07/04/06)	1.327	3,4	2.557	6.960	-
3º (07/04 a 02/06) ²	1.301	3,9	2.603	1.003	1.549
4º (02/06 a 11/08/06)	1.266	4,7	2.551	284	1.611
5º (11/08 a 06/10/06)	1.111	5,0	2.524	710	1.816
6º (06/10 a 15/12/06)	912	1,8	2.239	66	1.757

¹Imóveis cujos moradores não quiseram participar do estudo; ²Ciclo em que as palhetas de Eucatex foram substituídas por tecido de algodão cru.

Tabela 21 – Estimativa do número de ovos de *Aedes* spp.potencialmente removidos da parte sul do bairro do Engenho do Meio após a utilização de ovitrampas-controle (OVT-C) para a coleta massiva de ovos, no período de dez/2005 a maio/2006.

Ciclos de coleta massiva de ovos	Ovitrampas-Sentinelas			Ovitrampas-controle	
	N ^{o1}	Ovos/ciclo	N ^o médio ovos	N ^{o2}	N ^o estimado de ovos
Dez-04/ Jan-06	163	91.652	562,3	2.863	1.609.864,9
Fev/Mar/06	162	69.688	430,2	2.719	1.169.713,8
Abr/ Mai/06	149	173.476	1.164,3	2.752	3.204.153,6
Jun/jul/06	242	468.760	1.937,0	2.793	5.410.041,0
Ago/set/06	162	207.691	1.282,0	2.689	3.447.298,0
Out/nov/06	169	174.718	1.033,8	2.408	2.489.390,4
Total	1.047	1.185.985	1.132,7	16.224	17.330.461,7

¹Número de ovitrampas; ²Número representativo do somatório das ovitrampas-sentinelas e as ovitrampas-controle.

Tabela 22 – Número médio de ovos coletado em ovitrampas-sentinelas (OVT-S) instaladas nos bairros de Engenho do Meio (EM) durante a utilização de ovitrampas-controle (OVT-C) para a coleta massiva de ovos de *Aedes* spp., na parte sul do bairro, no segundo período de intervenção (IC-II), de dezembro/2005 a novembro/2006. A parte norte do bairro (EM-norte) e Brasília Teimosa (BT) não receberam OVT-C e foram utilizadas como testemunhas.

Período	Local	N ^o OVT-S ¹	N ^o médio de ovos (± DP)	Valor p
Pré-intervenção	EM-sul	589	1.173,0 (1.338,9)	0,483
	EM-norte	345	1.235,8 (1.306,2)	
	BT ³	661	1.732,2 (1.605,6)	
Intervenção	EM-sul	604	1.141,7 (1.213,7)	0,580
	EM-norte	531	1.188,8 (1.225,3)	
	BT	928	1.589,1 (1.399,0)	
Pós-intervenção	EM-sul	232	1.264,5 (1.061,3)	0,210
	EM-norte	199	1.140,1 (992,3)	
	BT	294	1.741,0 (1.525,3)	

¹Número de ovitrampas; ²Número representativo do somatório das ovitrampas-sentinelas e as ovitrampas-controle.

A análise da distribuição espacial do mosquito em uma área sem intervenção com OVT-C, Brasília Teimosa (BT), tomando o mês de abril em 2004, 2005, 2006 e 2007, como parâmetro, revela maior infestação por *Aedes* spp., nos dois últimos anos do que em 2004-

2005, e com maior dispersão e intensidade de infestação em 2006 (Figura 43). Os mapas mostram que existiam pontos de grande concentração do vetor, “hotspots” (pontos quentes) no bairro testemunha (BT), em todos os anos. Em Engenho do Meio, onde coletas massivas de ovos com OVT-C foram feitas por 5 meses (2005) e por 12 meses (2006), observa-se claramente menor intensidade da infestação nesses dois anos (Figura 43). Em 2006, na parte sul do bairro, onde foram instaladas as OVT-C, verifica-se, em comparação com abril do ano anterior no mesmo bairro, que houve manutenção do controle. Esta observação é reforçada quando se considera que no bairro-testemunho (BT) ocorreu naquele ano, o nível mais intenso de infestação. EM-sul recebeu, em 2006, uma quantidade maior de OVT-C (6.000 armadilhas/Km²) do que a utilizada em 2005 (4.140 armadilhas/Km²), entretanto a média de ovos depositados nas ovitrampas-sentinela em 2005 (364,1 ± 328,9) foi estatisticamente menor (P<0,000) do que a de 2006 (521 ± 471,2) (Tabela 22).

A análise de regressão demonstrou uma tendência temporal de crescimento significativo da população de *Aedes* spp. tanto em BT, área testemunha (p=0,002), quanto em EM (p=0,059) (Figura 42). Esta tendência também se confirmou pela análise espacial de Kernel (Figura 43).

Com a suspensão da coleta massiva de ovos pela retirada das OVT-C, em dezembro/2006, a densidade de mosquitos voltou a crescer em EM, em abril/2007, a média de ovos foi superior àquela observada em 2004, ano pré-intervenção (Figura 43).

Ovos de *Aedes* spp foram coletados ininterruptamente com ovitrampas nas áreas estudadas, demonstrando a presença constante do mosquito. O monitoramento através da pesquisa larvária também revelou a presença de *A. aegypti* na maioria dos bairros, exceto em Casa Forte ao longo de 2004. De acordo com os resultados de coleta de ovos, a pesquisa larvária subestimou a presença de *A. albopictus* em diversos momentos (Tabela 23).

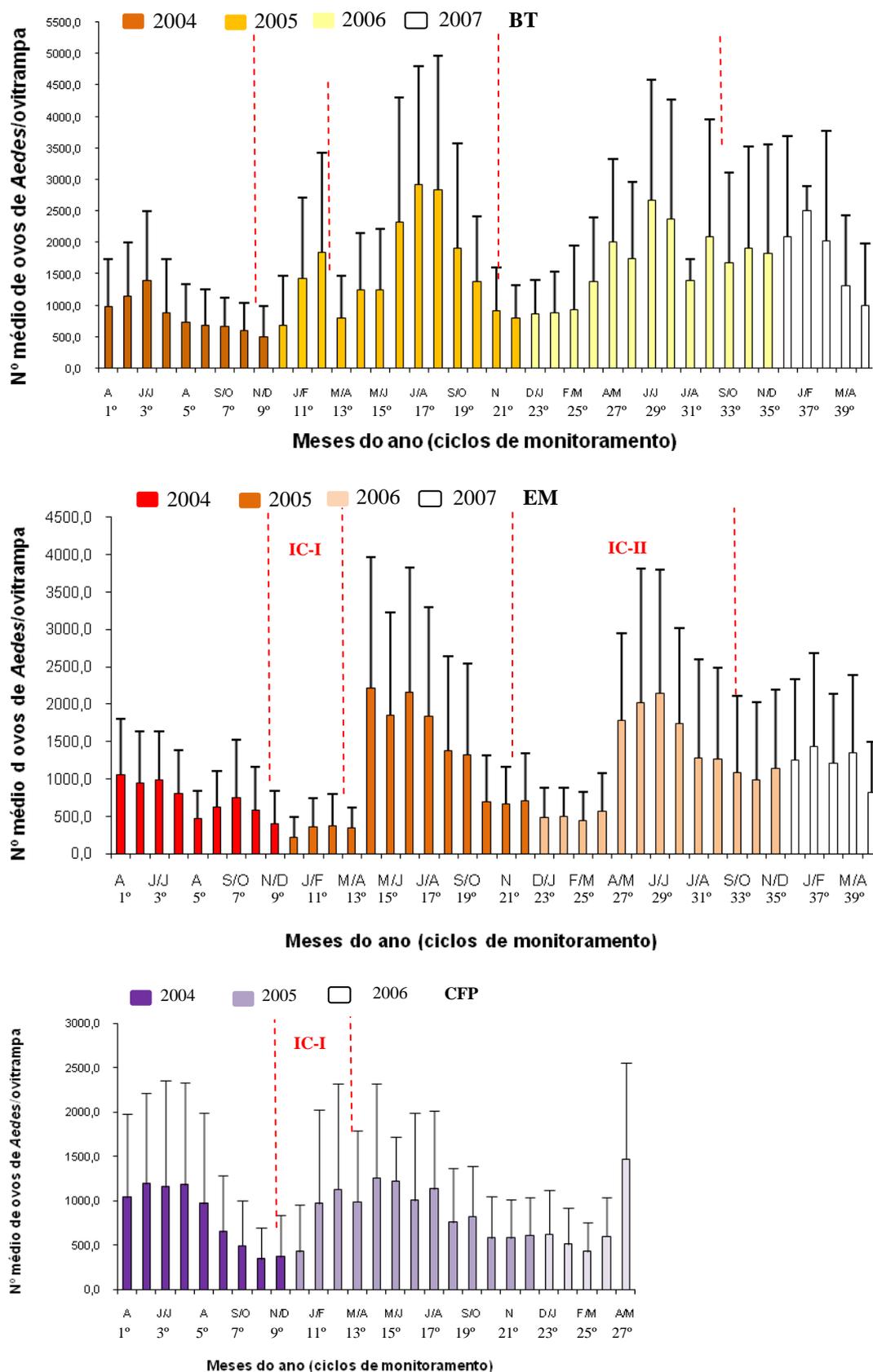


Figura 39 - Variação longitudinal/sazonal do número médio de ovos de *Aedes* spp observada para os bairros de Brasília Teimosa (BT), Engenho do Meio (EM) e Casa Forte/Parnamirim (CFP), Recife-PE, ao longo de 40 ciclos de monitoramento por ovitrampas sentinelas, no período de abril de 2004 a maio de 2007.

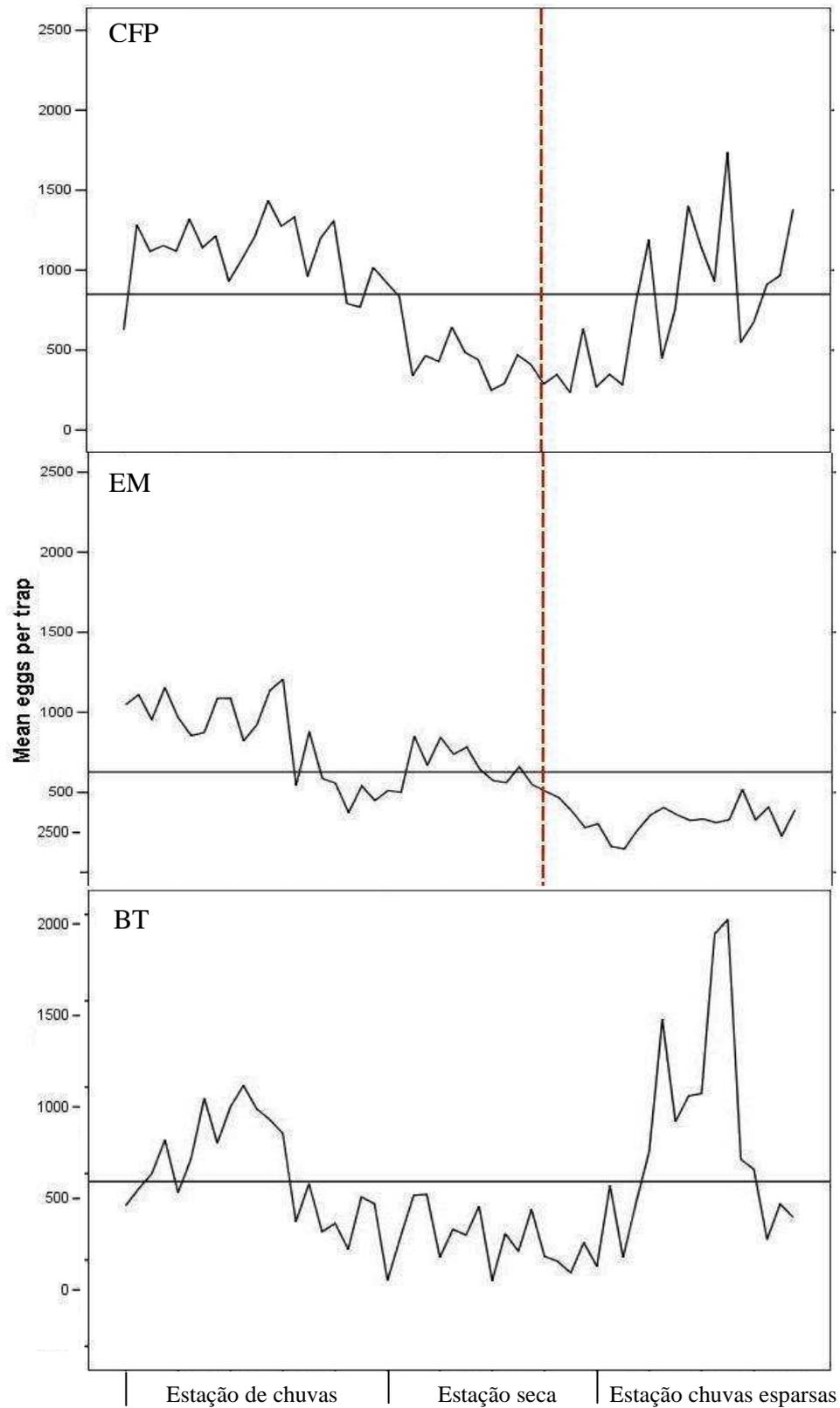


Figura 40 - Número de ovos de *Aedes* spp/ovitrampa sentinela/ 28 dias, coletado em diferentes áreas do Recife, de abril de 2004 a abril de 2005. A linha horizontal indica a média geral de ovos para o bairro e a linha vertical que corta Casa Forte/Parnamirim (CFP), Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa (BT) indica o momento em que foi iniciada a primeira intervenção de controle pela coleta massiva de ovos de *Aedes* spp nas duas primeiras áreas. O bairro de Brasília Teimosa foi usado como área controle. Fonte: REGIS *et al.* (2008).

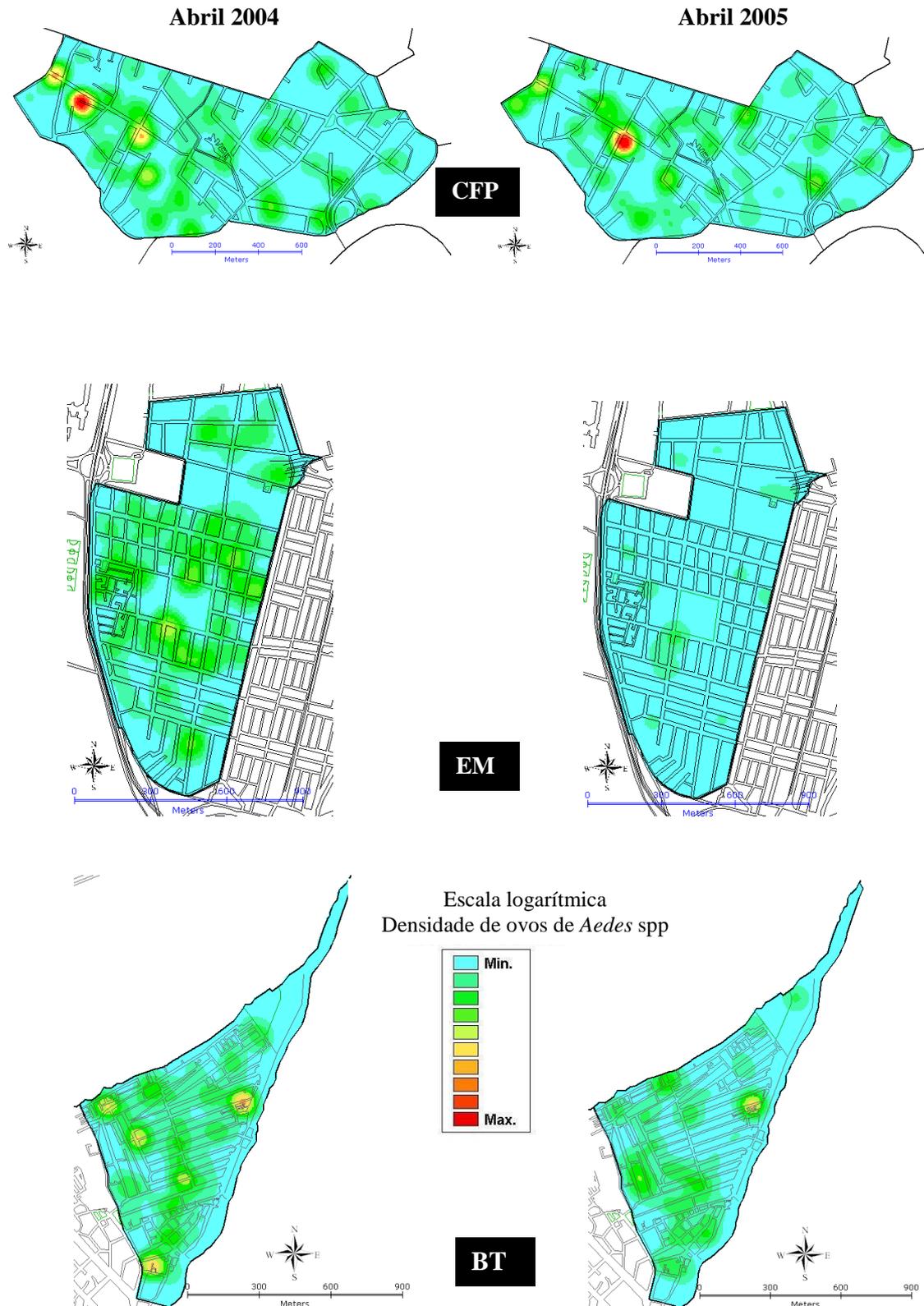


Figura 41 – Distribuição espacial da infestação por *Aedes* spp observada a partir da densidade Kernel de ovos, nos bairros de Casa Forte/Parnamirim (CFP), Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa (BT-área testemunha), Recife-PE. Os seguintes momentos foram avaliados: abril/2004 (anterior a intervenção com ovitrampas-controle/OVT-C) e abril/2005 (ao final da intervenção com OVT-C). Os pontos de maior infestação estão evidenciados pelas cores que variam do amarelo ao vermelho.

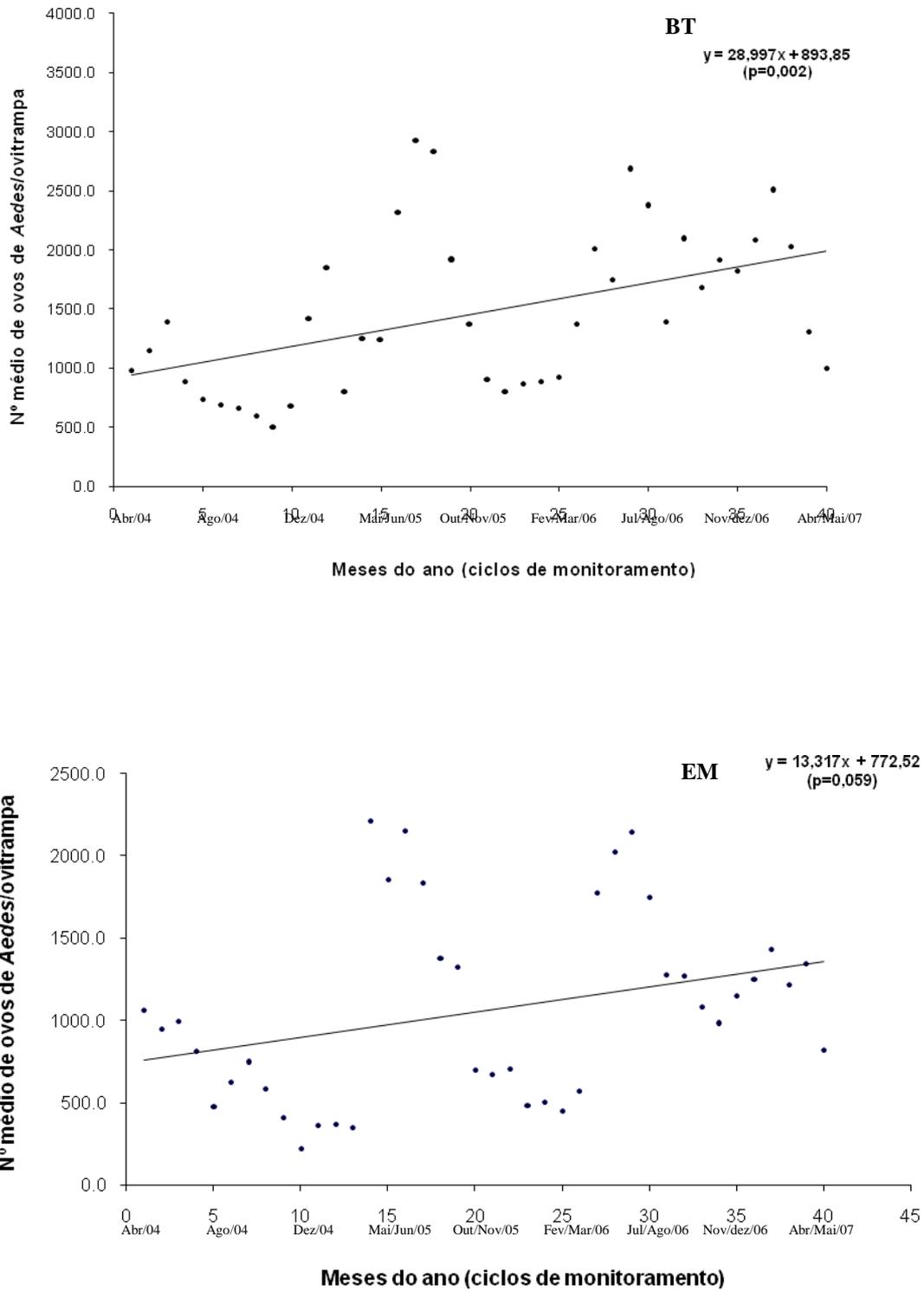


Figura 42 - Análise longitudinal da tendência de crescimento populacional de *Aedes* spp a partir do número médio de ovos coletados nas Ovitrapas-sentinelas (OVT-S), instaladas no bairro de Brasília Teimosa (BT) e Engenho do Meio (EM), Recife-PE, no período de abril de 2004 a maio de 2007.

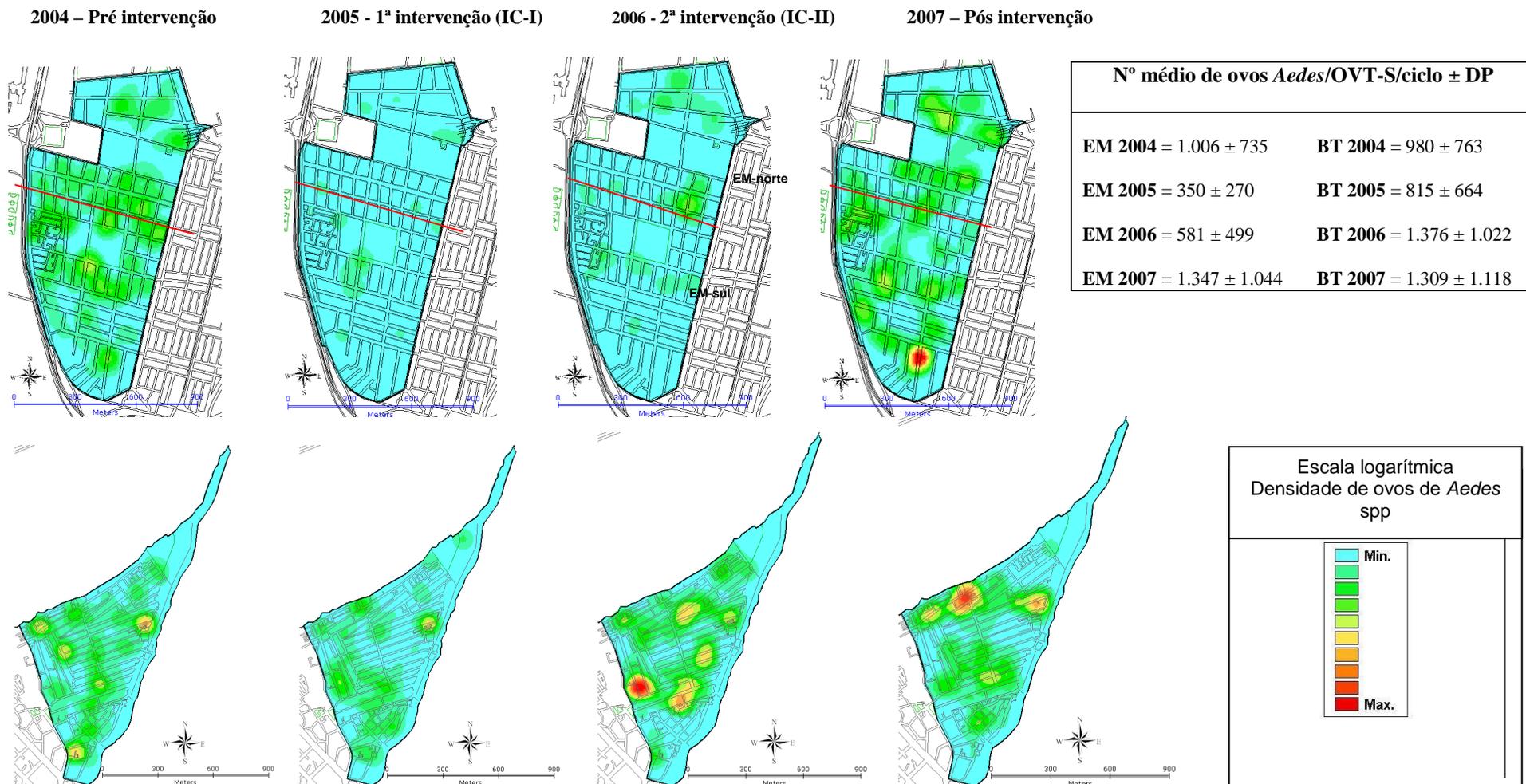


Figura 43 – Mapas de densidade Kernel evidenciando a infestação por *Aedes* spp, a partir da densidade de ovos, nos bairros de Engenho do Meio (EM) e Brasília Teimosa-área sentinela (BT), Recife-PE. A análise espacial foi feita nos seguintes momentos: abril/2004, antes da intervenção com ovitrapas-controle (OVT-C); abril/2005, primeira intervenção com OVT-C em todo o bairro de EM; abril/2006, segunda intervenção com OVT-C, na metade sul de EM e abril/2007, momento após as intervenções com OVT-C. Os pontos de maior concentração do mosquito estão destacados em tons de amarelo a vermelho.

Tabela 23 – Índices de Infestação Predial por *Aedes aegypti* (Aae) e *Aedes albopictus* (Aab) observados em bairros do Recife-PE nos anos de 2004, 2005 e 2006.

Bairros/ano	Levantamento de Índice Predial (%)											
	1° (janeiro)		2° (março)		3° (maio)		4° (julho)		5° (setembro)		6° (novembro)	
	Aae	Aab	Aae	Aab	Aae	Aab	Aae	Aab	Aae	Aab	Aae	Aab
2004												
Casa Forte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parnamirim	2,9	0	2,8	0,4	2,4	0,9	2,8	0,5	3,3	0	3,3	0
Engenho do Meio	8,0	0	2,5	0	3,9	0	2,2	0	1,9	0	1,9	0
Brasília Teimosa	2,0	0	0,6	0	0,8	0	1,2	0	1,1	0	1,1	0
2005¹												
Casa Forte/ Parnamirim	-	-	0,5	0	3,1	0	0,3	0	1,7	0,9	0,3	0
Engenho do Meio	-	-	3,3	0	4,6	0	4,7	0	0,9	0	1,7	0
Brasília Teimosa	-	-	0,9	0	4,1	0,3	2,4	0	2,7	0	1,0	0
2006¹												
Casa Forte/ Parnamirim	0,3	0	1,6	0	8,2	0,4	3,7	0,9	4,4	1,5	1,6	1,5
Engenho do Meio	1,7	0	1,6	0	4,4	0	8,2	1,0	1,6	0	1,5	0
Brasília Teimosa	1,0	0	2,8	0	1,1	0	3,7	0	3,3	0	1,0	0

¹Utilização dos valores do LIRA, metodologia baseada no aglomerado de bairros

Fonte: . Sistema de Informacao do Programa de Controle de Febre amarela e Dengue (SISFAD), (2008).

5.5 Discussão

Nossos estudos mostram evidências de que a coleta e destruição massiva de ovos de *A. aegypti* integrada à eliminação ou tratamento larvicida dos criadouros, pode causar um impacto negativo sobre a densidade populacional desta espécie, em áreas urbanas densamente infestadas. Demonstram, ainda, que o uso de ovitrampas-controle (OVT-C) tratadas com Bti, pode ser operacionalizado em larga escala, no contexto de pequenos ou grandes municípios, como Moreno e Recife, com a vantagem de remover grandes quantidades de ovos, que seriam lançados em diversos criadouros no ambiente.

Ovitrampas autocidas ou letais têm sido utilizadas, embora em raras ocasiões, desde a década de 1970. Estudos realizados nos anos 70 e 80 em Cingapura demonstraram a eficiência de ovitrampas autocidas como medida complementar para controle de *A. aegypti* (CHAN *et al.*, 1977; CHENG *et al.*, 1982). Utilizada durante um ano no aeroporto de Cingapura levou à erradicação do mosquito nesta área (CHAN *et al.*, 1977). Posteriormente, Zeichner, *et al.* (1999) demonstraram que a impregnação das palhetas das ovitrampas com inseticidas químicos, poderia torná-las letais tanto para as formas jovens quanto para as fêmeas do mosquito, pelo contato durante a oviposição. Mais recentemente, a eficácia de ovitrampas letais (OL) para controle de populações de *A. aegypti* tem sido demonstrada em diferentes regiões geográficas (PERICH *et al.*, 2003; RITCHIE, 2005; SITHIPRASASNA *et al.*, 2003; WILLIAMS, *et al.*, 2007).

Santos *et al.* (2003) e Stoops (2005) constataram que o Bti adicionado às ovitrampas além atuar como larvicida eficaz, garantindo seu uso por período mais prolongados em campo, também age como estimulante a oviposição de *Aedes* spp.

O desempenho da ovitrampa para coleta massiva de ovos tem sido também aperfeiçoado pela ampliação da superfície disponível à oviposição. Em bairros do Recife, município do Nordeste do Brasil, ovitrampas tratada com Bti, contendo cada uma três palhetas de eucatex, coletaram em média 722 ovos/ovitrampa/mês, com valor máximo de 7.784 ovos em uma única

armadilha (REGIS *et al.*, 2008). Lenhart, *et al.* (2005) também referem um aumento de três vezes na capacidade de coleta da ovitrampa, quando esta foi revestida internamente com tecido.

No estudo IV realizado em Moreno, o uso do larvicida biológico para o tratamento de criadouros associado à coleta de ovos com ovitrampas-controle levou a uma diminuição de aproximadamente 40% da densidade de ovos de *Aedes* spp., nos bairros de NSF, MAS e NSG, enquanto que no bairro controle (Centro) foi registrado um aumento de 100% na densidade de ovos. Estes dados sugerem que a redução de ovos nos dois primeiros ciclos pode estar mais relacionada a uma melhor cobertura larvicida, resultante da diminuição dos intervalos entre aplicações do Bti nos depósitos, do que à remoção massiva de ovos nas áreas tratadas. Embora seja impossível analisar as duas variáveis de forma independente, o efeito da remoção de ovos parece ser mais claro a partir do 3º ciclo de coleta, visto o número de ovos/OVT/dia permaneceu igual ou menor do que o observado no 1º ciclo, apenas nas áreas sob intervenção.

Nos bairros de Moreno, a maior redução na densidade de ovos, da ordem de 75%, foi atingida no 2º ciclo, ou seja, cerca de 70 dias após o início das intervenções de controle. Nos meses subsequentes a redução ficou próxima a 40%. Estes resultados indicam que provavelmente novos criadouros surgiram na área e que a pressão de repovoamento foi mais forte do que a de controle. Logo, a manutenção ou o aumentando da efetividade das ações só seria atingido se ampliada a cobertura do tratamento larvicida ou a eliminação física dos criadouros recém introduzidos nas áreas. Alguns modelos probabilísticos estimam que a eliminação de 90% dos criadouros em uma área, associada à eliminação de ovos através de armadilhas de oviposição, promoveriam uma redução na abundância de *A. aegypti* da ordem de 96%, ao final de 42 dias de intervenção (KNIPLING, 1970).

A manutenção de percentuais elevados de positividade das ovitrampas-controle durante o período de intervenção denota que as armadilhas concorreram com os criadouros presentes no ambiente, mas indica, ao mesmo tempo, que a estratégia empregada não causou impacto significativo sobre a distribuição espacial de *Aedes* spp naquelas áreas. Isto pode significar que houve apenas uma redução na quantidade de fêmeas nestes ambientes, ou seja, é possível supor

que a densidade de fêmeas encontrada em um imóvel cuja ovitrampa coletou mais de 1.000 ovos é tecnicamente diferente da observada em um com coleta inferior a 100 ovos.

Quando as ovitrampas-controle foram utilizadas de forma ininterrupta em NSF-Moreno, desde 2003 até 2007, mais uma vez foi constatado o efeito de redução da densidade de ovos, com manutenção de percentuais elevados de positividade das ovitrampas. Isto revela que a população local de *A. aegypti* continuou bastante disseminada na área, porém em baixas densidades, o que confirma o comportamento de dispersão de ovos em diferentes criadouros como uma estratégia de sobrevivência desta espécie. Por outro lado, é possível que a pressão de controle imposta, embora sustentada por longo período (quatro anos), não tenha sido suficiente para causar impacto maior, tornando-se, portanto, necessário intensificar a eliminação de criadouros e aumentar o número de ovitrampas-controle para reduzir substancialmente a distribuição do vetor no bairro.

Nos bairros do Recife, a estratégia de eliminação massiva de ovos com OVT-C, implementada de dezembro/2004 a abril/2005, causou uma redução significativa, porém temporária, da população de *A. aegypti*, durante o período de janeiro a abril. A estratégia foi eficiente tanto em Engenho do Meio (EM), quanto em Casa Forte-Parnamirim (CFP), quando os dados de densidade de ovos são comparados com os de um bairro sem intervenção, Brasília Teimosa (BT). A comparação entre as áreas tratadas mostrou que os efeitos foram muito mais acentuados em EM do que em CFP. Esta diferença foi de certa forma esperada, visto que em EM foram usadas duas vezes mais armadilhas do que em CFP, bairro com predominância de imóveis verticalizados, onde a recusa à instalação de armadilhas foi maior e a área de cobertura, em m², foi menor, visto que as OVT-C foram instaladas apenas no pavimento térreo. Um dos poucos estudos sobre a distribuição vertical de *A. aegypti*, demonstrou que esta espécie pode colonizar criadouros localizados a mais de 25 m do solo, ou seja, a uma altura compatível com a de edifícios de três ou mais andares (CHADEE, 2004).

Os resultados obtidos em EM com uma concentração ≥ 4000 OVT-C/km², demonstram que a coleta-destruição massiva de ovos de *Aedes* através de ovitrampas-controle, iniciada em dezembro de cada ano e mantida por no mínimo cinco meses, pode prevenir o crescimento

populacional explosivo do mosquito nos primeiros meses do ano, período geralmente associado à maior concentração de casos de dengue (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Os resultados mostram que a área volta a ficar densamente infestada quando as OVT-C são retiradas de campo, mesmo após um ano de uso. É importante ressaltar que o uso desta estratégia requer um sistema de monitoramento populacional capaz de indicar períodos críticos.

Nossos resultados sugerem que as OVT-C utilizadas em grande quantidade no início da estação seca podem reduzir de forma mais eficiente a disseminação dos ovos em campo e ao mesmo tempo aumentar a pressão de controle antes do aparecimento das primeiras chuvas de verão. Alguns estudos supõem que a baixa precipitação verificada em determinadas regiões brasileiras durante os meses mais quentes do ano seja o elemento desencadeador do crescimento populacional de *Aedes* spp, cuja tendência é o aumento exponencial em função da ativação dos ovos quiescentes, à medida que as chuvas se tornam mais frequentes (REGIS *et al.*, 2008; RÍOS-VELÁSQUEZ *et al.*, 2007).

De acordo com Knipling (1970) a eficiência da ovitrampa parece ser inversamente proporcional ao número de sítios competidores no ambiente. Assim, seria incorreto pensar que o uso exclusivo de ovitrapas sem a eliminação dos criadouros reais e potenciais ou sua proteção contra a colonização de *A. aegypti* possa levar a uma situação sustentável de controle. Cheng *et al.* (1982) referiram resultados similares aos encontrados em nossos estudos, utilizando três ovitrapas autocidas/imóvel, em uma área urbana de Houston/Texas. Em experimento realizado no Rio de Janeiro, Perich *et al.* (2003) utilizaram, maior concentração de ovitrapas-letais (OL) (10 por imóvel) e observaram, após três meses, que o número de fêmeas de *A. aegypti* coletado nas casas com OL foi, no mínimo, três vezes menor do que nas casas da área controle. Os autores observaram ainda que a redução foi mais rápida na área com menor número de criadouros no ambiente, indicando que estas armadilhas podem ser mais eficientes quando integradas a ações de programas com participação comunitária na eliminação de criadouros. Sithiprasasna *et al.* (2003) empregou o mesmo modelo de ovitrampa letal, por períodos maiores (sete meses) em vilas da Tailândia e também registraram a eficiência de ovitrapas letais no controle de *A. aegypti*, concordando com Perich *et al.* (2003) sobre a importância de reduzir, simultaneamente, a presença de criadouros no ambiente. Ovitrapas letais têm sido utilizadas em associação com

ações para eliminação de criadouros e aplicação intradomiciliar de piretróides no programa de controle da dengue no norte de Queensland/Austrália, desde 2004 (RITCHIE, 2005). Williams *et al.* (2006) sugerem que quatro OLS/imóvel seria o número ideal de armadilhas, no contexto local da Austrália. Experimentos em laboratório e campo, utilizando OLS tratadas com o piretróide bifenthrin, revelaram que estas armadilhas recebem menos oviposição do que ovitrampas não tratadas, e parece ser menos aceita como sítios de oviposição, não apenas em termos do número de ovos postos, mas também na probabilidade cumulativa de se tornar positiva, no tempo (WILLIAMS *et al.* 2007). Os autores reconhecem que estes achados requerem estudos mais controlados que reavaliem o impacto específico das OLS sobre as populações naturais de *A. aegypti* de Queensland. Segundo Ferrari (1996), a resistência comportamental aos inseticidas químicos apesar de ser de difícil mensuração, pode ser caracterizada pela observação repetida do comportamento de recusa do inseto-alvo aos sítios tratados com o inseticida.

Nossos resultados demonstram a eficiência de controle através da coleta-destruição massiva de ovos com ovitrampas tratadas com Bti, e que o impacto sobre a densidade populacional do mosquito depende da quantidade de ovos destruídos e conseqüentemente da abrangência e do tempo de uso das armadilhas em campo. Permitem ainda afirmar que estratégias direcionadas à coleta e eliminação de ovos de *A. aegypti* são de fundamental importância em programas de controle, diante da necessidade de impedir a permanência de populações do mosquito, sob a forma de ovos dormentes, no ambiente. Ações dirigidas, simultaneamente a eliminação e controle ostensivo de criadouros larvários e eliminação de ovos pode levar a redução progressiva e sustentável da densidade populacional deste culicídeo.

Em seu conjunto, os resultados deste estudo sublinham a possibilidade e a importância de utilizar as OVT-C como um instrumento com potencial para estimular o engajamento das comunidades, pela adoção destas armadilhas vigiadas e seguras, destinadas ao recolhimento e destruição massiva de ovos do mosquito, aliado às ações para eliminação de outros criadouros potenciais do ambiente domiciliar.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir:

6.1 Quanto ao monitoramento populacional de *Aedes* spp. através de ovitrampas:

Os modelos de ovitrampa testados neste estudo foram eficientes para o monitoramento populacional de *A. aegypti* e *A. albopictus* em área com baixo ou elevado nível de infestação;

Ovitrampas tratadas com Bti são eficientes para o monitoramento contínuo de *Aedes* spp. em áreas urbanas infestadas, com sensibilidade para detectar flutuações temporais na densidade populacional e identificar locais com maior concentração populacional do mosquito. O modelo contendo 2L de infusão de garmíneas mostrou ser apropriado a períodos de monitoramento contínuo, inferiores a 28 dias;

Os índices estimados a partir de ovos revelaram ampla e elevada infestação por *Aedes* spp. nos bairros estudados em Recife e Jaboatão dos Guararapes nos anos de 2001 a 2007, em discordância com os índices prediais baseados em pesquisa larvária.

A. aegypti é a espécie predominante na maioria das áreas estudadas, exceto em alguns bairros com grande cobertura vegetal, onde a frequência de *A. albopictus* foi maior;

Observa-se um padrão de distribuição espacial com forte tendência à agregação dos imóveis mais intensamente infestados por *Aedes* spp. e à distribuição aleatória no caso de imóveis negativos.

6.2 Quanto ao biolarvicida:

A avaliação de diferentes lotes do pó técnico Antilarv® indica reprodutibilidade das condições de produção. Pequenas variações da atividade tóxica observadas não tiveram influência sobre o desempenho do produto em campo;

O pó técnico e o comprimido *Antilarv*® são igualmente eficientes para o controle de *A. aegypti* e apresentam atividade larvicida residual prolongada, de até seis meses, em recipientes não expostos ao sol;

Dos fatores renovação de água, densidade larvar e radiação solar apenas este último reduziu a atividade residual do produto;

Esporos do Bti são capazes de se reciclar em criadouros de *A. aegypti*, mantendo a atividade larvicida no ambiente tratado, por períodos prolongados.

6.3 Quanto ao uso de ovitrampas-controle associada às outras estratégias de controle:

A coleta e destruição massiva de ovos de *A. aegypti* integrada ao tratamento larvicida dos criadouros, exerceu impacto negativo sobre a densidade populacional desta espécie, em áreas urbanas densamente infestadas;

A estratégia baseada no uso das ovitrampas-controle por períodos curtos (cinco a doze meses) pode promover uma redução importante, porém temporária da densidade populacional de *Aedes* spp.;

A estratégia baseada no uso contínuo das ovitrampas-controle por períodos mais longos (4 anos) resultou em redução progressiva e sustentável da densidade populacional de *Aedes* spp.;

A eficiência de controle complementar de *Aedes* spp. por ovitrampas depende da quantidade de ovos destruídos e conseqüentemente da abrangência e do tempo de uso das armadilhas em campo, bem como dos resultados das demais ações de controle.

O Bti granulado nas concentrações avaliadas garantiu o uso contínuo e seguro das OVT-C em áreas urbanas infestadas por *Aedes* spp., por períodos de até 70 dias;

REFERÊNCIAS

- ACIOLI, R. V. **Uso de armadilhas de oviposição (ovitrampa) como ferramenta para o monitoramento populacional do *Aedes* spp. em bairros do Recife.** 140 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.
- AI-LEEN, T. G.; SONG, R. J. The use of GIS in ovitrap monitoring for dengue control in Singapore. **Dengue Bulletin**, Geneve, v. 24, p. 110-116, 2000.
- ALLAN, S. A.; KLINE, D. L. Evaluation of organic infusions and synthetic compounds mediating oviposition in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, n. 11, p. 1847-1860, 1995.
- AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, R. M.; MARTINS, P. H. **Abordagem ecossistêmica em saúde: ensaios para o controle de dengue.** Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005.
- ALBUQUERQUE, C. M. R., *et al.* Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área da Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, p. 314 - 15, 2000.
- ALMEIDA, P. S. *et al.* Distribuição espacial de *Aedes albopictus* na região sul do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1094-1100, 2006.
- ALMEIDA, E. A. P. **Padrão de oviposição e ciclos gonotróficos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) em Laboratório.** 2003. 37 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- ALTO, B. W.; JULIANO, S. A. Precipitation and temperature effects on populations of *Aedes albopictus* (Diptera: culicidae): implications for range expansion. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 38, p. 646-656, 2001.
- ALY, C. Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 45, p. 1-8, 1985.

ALY, C.; MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 46, p. 251-258, 1985.

ANASTÁCIO, D. B. **Estudo da distribuição espacial da resistência ao inseticida químico temephos em populações de *Aedes aegypti*, no município do Recife-PE.** 27f. 2002. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)-Faculdade Frassinete do Recife, Recife, 2002.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, N; ELLAR, D. J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 94, p. 63-68, 1992.

APOSTOL, B. L., *et al.* Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 5, p. 89-97, 1994.

ARAÚJO, A. P. **Avaliação da eficácia e persistência de larvicidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e de um análogo do hormônio juvenil à base de pyriproxyfen, no controle de *Aedes aegypti*.** 2003. 32 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

_____. **Avaliação de um biolarvicida à base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* desenvolvido no Brasil para o controle do *Aedes aegypti*.** 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

ARAÚJO, A. P. *et al.* Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, San Diego, v. 41, p. 339-347, 2007.

ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Biological control program against simuliids in the State of São Paulo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 131-133, 1995.

AVILLIS, S. M. N. **Fumace combate a dengue na praça do Pacificador.** Disponível em: <<http://www.duquedecaxias.rj.gov.br/web/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=2612&sid=13>> Acesso: 8 abril 2008.

AYRES, C. F. J.; ROMÃO, T. P. A.; MELO-SANTOS, M. A. V., FURTADO, A. F. Genetic Diversity in Brazilian Populations of *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.

_____. PROTA, J. R. M., MELO-SANTOS M. A. V., REGIS, L., SOLÉ-CAVA, A. M., FURTADO, A. F. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro and macro-geographic levels in Brazil. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 20, n. 4, p.350-356, 2004.

BARATA, E. A. M., *et al.* População de *Aedes aegypti* em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 237-242, 2001.

BATISTA FILHO, A. *et al.* Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 917-956.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 383-396.

_____. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 18, p. 57-62, 2002.

_____. Control of mosquitoes. In: BECKER, N. *et al.* **Mosquitoes and their control**. New York: Kluwer Academic, 2003. p. 345-375.

BECKER, N. *et al.* Efficacy of a new tablet formulation of an asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, Santa Ana, v. 16, p. 176-182, 1991.

_____. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 8, n. 3, p. 285-289, 1992.

_____. **Mosquitoes and their control**. New York: Kluwer Academic, 2003.

BECKER, N.; RETTICH, F. Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 10, n. 4, p. 527-533, 1994.

BENJAMIN, S. *et al.* Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation, vectobac DT, for control of dengue mosquito vectors in potable water containers. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 36, p. 879-892, 2005.

BESERRA, E. B. *et al.* Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 853-860, 2006.

BLACK, W. C.; MOORE, C. G. Population biology as a tool for studying vector-born disease. In: BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. **The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996. p. 393-416.

BOISVERT, M.; BOISVERT, J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. **Biocontrol Science and Technology**., Abigdon, v. 10, p. 517-561, 2000.

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**, Brasília, v. 33, p. 347-53, 2000.

_____. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 199-203, 2004.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v. 16, p. 113-118, 2007a.

_____. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007b.

BRASIL. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_semana52_2005.pdf>. Acesso: 11 abril 2006.

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between femal body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 36, p. 165-172, 1990.

BRYANT, J. E. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture Ecosystems & Environment**, [S.l.], v. 49, p. 31-35, 1994.

CANYON, D. V.; HIL, J. L. K.; MULLER, R. Adapitation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behavior in response to humidity and diet. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, p. 959-964, 1999.

CAPALBO, D. *et al.* Produção de bactérias entomopatogênicas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 239-256.

CÉRON, J. Formulaciones. In: BRAVO, A., CERON, J. **Bacillus thuringiensis en control biológico**. Bogotá: Buena Semilla, 2004. p. 275-293.

CHADEE, D. D. Observations on the seasonal prevalence and vertical distribution patterns of oviosition by *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in urban high-rise apartments in Trinidad, West Indies. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, p. 323-330, 2004.

CHADEE, D. D.; COBERT, P. S. Diel patterns of oviposition indoors of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Dipteria: Culicidae) in Trinidad, W.I.: a preliminary study. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 84, p. 79-84, 1990.

CHADEE, D. D. *et al.* Oviposition response of *Aedes aegypti* mosquitoes to different concentrations of hay infusion in Trinidad, West Indies. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 9, n. 3, p. 346-348, 1993.

CHAN, K. L.; KIAT, N. S.; KOTH, T. K. An autocidal ovitrap for the control and possible eradication of *Aedes aegypti*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 8, p. 56-62, 1977.

CHARLES, J-F. Histopatologie de l' actino de la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur larves d'*Aedes aegypti* (Dipetra: Culicidae). **Entomophaga**, [S.l.], v. 26, p. 203-212, 1981.

_____. Action de la δ endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur cultures de cellules de *Aedes aegypti* L. en microscopie eletronique. **Annals of Microbiology**, London, v. 134A, p. 365-381, 1983.

CHENG, M-L. *et al.* Role of a modified ovitrap in the control of *Aedes aegypti* in Houston, Texas, USA. **Bulletin of the World Health Organization**, Washington, DC, v. 60, n. 2, p. 291-296, 1982.

CHIARAVALLOTI-NETO F. Conhecimentos da população sobre dengue, seus vetores e medidas de controle em São José do Rio Preto, São Paulo. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 447-453, 1997.

CHIAVALLOTI-NETO, F. *et al.* Controle do vetor do dengue e participação da comunidade em Catanduva, São Paulo, Brasil. Rio de Janeiro, **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, p. 1739-1749, 2003.

CLARO, L.B.L.; TOMASSINI, H.C.B.; ROSA, M.L.G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 6, p. 1447-1457, 2004.

CLARK, G. G., SEDA, H., GUBLER, D. J. Use of "CDC backpack aspirator" for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 10, p. 119-124, 1994.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**, vol. 1. London: Chapman & Hall, 1992.

_____. **The biology of mosquitoes**, vol.II. London: Chapman & Hall, 1999.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1994, 228 p.

CORDEIRO, M. T. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987-2006; epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes**. 2008. 214 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2008.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 297-314.

CRICKMORE, N., *et al.* Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 131, p. 249-254, 1995.

DE BARJAC, H. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* sérotype H14. **Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences**, Paris, v. 286, p. 297-314, 1978.

_____. Characterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies**. New Jersey: Rutgers University Press, 1990. p. 10-15.

DE BARJAC, H.; LARGET- THIERY, I. **Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations**. Paris: Unite des Bacteries Entomopathogenes Institut Pasteur, 1984. (WHO/VBC/84.892).

DEGALLIER, N. *et al.* *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. **Revista de Saúde Pública, São Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 386-387, 2003.

DES ROCHES, B.; GARCIA, R. Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. **Mosquitoes News**, Fresno, v. 44, p. 160-165, 1984.

DIBO, M. R. *et al.* Identification of the best ovitrap installation sites for gravid *Aedes (Stegomyia) aegypti* in residences in Mirassol, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 339-343, 2005.

DONALISIO, M. R.; ALVES, M. J. C. P.; VISOCKAS, A. Inquérito sobre conhecimentos e atitudes da população sobre a transmissão do dengue – região de Campinas, São Paulo, Brasil – 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, nº 2, p. 197-201, 2001.

DONALISIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores da Dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

DULMAGE, H. T.; CORREA, J. A.; GALLEGOS-MORALES, G. Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation

development. In: DE BARJAC, H; SUTHERLAND, D. J. **Bacterial control of mosquitoes and black flies**. New Jersey: Rutgers University Press, 1990. p. 110-160.

EDMAN, J. D. *et al.* *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 35, p. 578-583, 1998.

ELDRIDGE, B. F., EDMAN, J. D. **Medical Entomology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

FACCHINELLI, L. *et al.* A Development of a novel sticky trap for container-breeding mosquitoes and evaluation of its sampling properties to monitor urban populations of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 21, p. 183-195. 2007.

FANTINATTI, E. C. S. *et al.* Abundância e agregação de ovos de *Aedes aegypti* L. e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no norte e noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 6, p.954-960.

FAY, R. W.; PERRY, A. S. Laboratory studies of the oviposition preferences of *Aedes aegypti*. **Mosquitoes News**, Fresno, v. 25, n. 3, p. 276-281, 1965.

FAY, R.W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition sites as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosquitoes News**, Fresno, v. 26, p. 531-535, 1966.

FERNÁNDEZ, Z.; FORATTINI, O. P. Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e história reprodutiva. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 3, 285-291, 2003.

FERRARI, J. A. Insecticide resistance. In: BEATY B. J., MARQUARDT, W. C. **The biology of disease vectors**. Niwot: University Press of Colorado. p. 512-529, 1996.

FOCKS, D. A. **A review of entomological samples methods and indicators for dengue vector**. Geneva: WHO, TDR, 2003. (TDR/IDE/Den/03.1).

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 1962.

_____. **Entomologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 1965.

_____. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, p. 244-45, 1986.

_____. **Culicidologia Médica**, vol. I. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 1996.

FRANÇA, E.; ABREU, D.; SIQUEIRA, M. Epidemias de dengue e divulgação de informações pela imprensa. **Cadernos de Saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 5, p. 1334-1341, 2004.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa)**. Brasília, 1996.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Boletim Epidemiológico do Dengue**. Brasília, 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Monitoramento da Resistência das Populações de *Aedes aegypti* do País**. Brasília, 2000.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Plano de Intensificação das ações de Controle da Dengue (PIACD)**. Brasília, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Vigilância epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Vigilância epidemiológica: Situação atual da dengue no Brasil**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 29 ago. 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Vigilância epidemiológica: Situação atual da dengue no Brasil**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em 08 jun. 2005.

GAMA, R. A. *et al.* Evaluation of the sticky MosquiTRAPTM for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) during the dry season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, p. 294-302, 2007.

GARCIA, R.; DES ROCHERS B.; TOZER, W. Studies on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against organisms found in association with mosquito larvae. **Mosquito and Vector Control Association**, Fresno, v. 48, p. 33-36, 1980.

GEORGHIOU, G. P. *et al.* Potencial for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring Countries. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 24, p. 290-294, 1987.

GETTIS, A. *et al.* Characteristics of the spatial pattern of the dengue vector, *Aedes aegypti*, in Iquitos, Peru. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, n. 5, p. 494-505, 2003.

GILL, S. S.; COWLES E. A.; PIETRANTONIO P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 616-636, 1992.

GLASSER, C. M.; GOMES, A. C. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, p. 166-172, 2002.

GOLDBERG, L.; MARGALIT, G. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*. **Mosquitoes News**, Fresno, v. 37, p. 355-358, 1977.

GOMES, A. C.; MARQUES, G. R. A. M. Encontro de criadouro natural de *Aedes (Stegomyia) Albopictus* (Skuse), Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, p. 245, 1998.

GOMES, A. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (stegomyia) aegypti* e *Aedes (stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 7, n. 3, p. 49-57, 1998.

_____. Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 79-80, 2002.

GOMES, T. C. S. **Reavaliação do status de susceptibilidade ao temephos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do município de Recife – PE.** 2006. 38 f. Monografia

(Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

GUBLER, D.; CLARK G. G. Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, p. 55-57, 1995.

GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997, p. 45-60.

GUEDES, D. R. D. **Epidemiologia molecular do *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2006.

GUNTHER *et al.*, Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, México. **Intervirology**, Basel, v. 50, p. 347-352, 2007.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In S.B. ALVES, **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998. p 383-446.

HABIB, M. E. M.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A. **Padronização de inseticidas microbianos**. In S.B. ALVES, **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 779-797.

HALES, S., PANHIUS, W. A new strategy for dengue control. **The Lancet**, London, v. 365, p. 551-552, 2005.

HARRINGTON, L. C.; SCOTT T. S.; LERDTHUSNEE K. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, p. 209-220, 2005.

HAWLEY, W.A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 4, p. 2-39, 1988.

HOCK, J. W. [Armadilha e aspirador costal para coleta de formas adultas de *Aedes*]. Disponível em: <<http://www.johnwhock.co/products/112.htm>>. Acesso: 10 jan 2008.

HOECK, P. A. E. *et al.* Population and parity levels of *Aedes aegypti* collected in Tucson. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 28, p. 1-9, 2003.

HOLCK, A. R.; MEEK, C. L.; MEEK, J. C. Attractant enhanced ovitraps for the surveillance of container breeding mosquitoes. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 4, p. 97-98, 1988.

HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 385-391, 2001.

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, 2003.

HOUGARD, J. M., *et al.* Twenty-two years of blackfly control in the Onchocerciasis Control Programme in west Africa. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 13, p. 425-431, 1997.

IBGE. **Censo Demográfico 2000**. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2000/default.shtm>>. Acesso: 12 out. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (Brasil). 3º Distrito de Meteorologia [Dados pluviométricos do período de 2000 a 2008]. Recife, 2008

JABOATAO DOS GUARARAPES. **Banco de dados do monitoramento de *Aedes aegypti* por Ovitrapas [período de 2002 a 2003]**. Jaboaão dos Guararapes, 2008.

JONES, J. W., *et al.* Evaluation of selected traps as tools for conductin surveillance for adult *Aedes aegypti* in Thailand. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 2, p. 148-150, 2003.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R. C. Transovarial transmission of dengue 3 by *Aedes aegypti*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, p. 643-644, 1996.

KAY, B.; NAM, V. S. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. **The Lancet**, London, v. 365, p. 613-617, 2005.

KITRON, U.D.; WEBB, D.W.; NOVAK, R.J.. Oviposition behavior of *Aedes triseriatus* (Diptera:Culicidae): prevalence, intensity and aggregation of eggs in oviposition traps. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 26, n. 5, p. 462-467, 1989.

KHAWALED, K.; BARAK, Z.; ZARITSKY, A. Feeding behavior of *Aedes aegypti* larvae and toxicity of dispersed and of naturally encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, p. 419-426, 1988.

KHIN, M. M.; THAN, K. A. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 32, p. 590-594, 1983.

KLINE, D. L. Traps and trapping techniques for adult mosquito control. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 3, p. 490-496, 2006.

KNIPLING, E. F. **A theoretical appraisal of the value of ovitraps for the suppression of container-breeding mosquitos**. United States, 1970 (W.H.O./VBC/70.186).

KOURI, G. P. *et al.* Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 67, p. 375-380, 1989.

KOW, C. Y.; KOON, L. L.; YIN, P. F. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 38, p. 475-479, 2001.

KROCKEL, U. *et al.* New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 2, p. 229-238, 2006.

KUNO, G. Review of the factors modulating dengue transmission. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 17, p.321-335, 1995.

LEFÈVRE, F. *et al.* Representações sociais sobre as relações entre vasos de plantas e o vetor da dengue. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 405-414, 2004.

LENHART, A. E. *et al.* A. Building a better ovitrap for detecting *Aedes aegypti* oviposition. **Acta Tropica**, Basel, v. 96, p. 56-59, 2005.

LENZI, M. F.; COURA, L. C. Prevenção da dengue: a informação em foco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 343-350, 2004.

LIMA-CAMARA, T. N.; HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2079-2084, 2006.

LIMA, J. B. P. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphate in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santos, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIMA, J. B.; MELO, N. V.; VELLE, D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Sao Paulo, v. 47, n. 3, p. 125-139, 2005.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, p. 43-45, 2004.

LUNA, C. L.; LOPES, C. E.; MASSARANI, G. Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 spores from growth medium by flocculation/sedimentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 25, p. 213-216, 2003.

MACIEL-DE-FREITAS R, EIRAS AE, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Field evaluation of the BG-sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 321-325, 2006.

MACIEL-DE-FREITAS, *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, p. 489-496, 2007.

MACORIS, M. L. G., *et al.* Factors favoring houseplant container infestation with *Aedes aegypti* larvae in Marília, São Paulo, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 1, n. 4, p. 280-286, 1997.

_____. Alteração da resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

_____. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 703-708, 2003.

MANASHEROB, R. *et al.* Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p. 1750-1758, 1998.

MAPA de Pernambuco. Disponível em:

<<http://www.viagemdeferias.com/mapa/pernambuco.gif>>. Acesso: 10 jan 2008.

MARDINI, L. B. L. F. *et al.* *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 211-214, 2000.

MARQUES, C. C. A. *et al.* Estudo comparativo da eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, p. 237-241, 1993.

MARTINS, V. E. P. *et al.* First report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the state of Ceará, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 4, 2006.

MELO-SANTOS, M. A. V. [Ovos, pupas e criadouros peridomiciliares de *Aedes aegypti*]. Recife, 2000a. 7 fotografias.

MELO-SANTOS, M. A. V. [Formulações e produtos á base de Bti, ovitampa instalada em área peridomiciliar e método de contagem de ovos de *Aedes* em laboratório]. Recife, 2000b. 8 fotografias.

MELO-SANTOS, M. A. V. **Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2001a.

MELO-SANTOS, M. A. V. *et al.* Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 859-860, 2001b.

MICIELI, M. V.; CAMPOS, R. E. Ovoposition activity and seasonal pattern of a population of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Sultropical Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 659-663, 2003.

MILLER, B. R.; BALLINGER, M. E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. **Transactions of the Royal society of tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 82, p.476 – 477, 1988.

MOGI, M. *et al.* Inter and intraspecific variation in resistance to desiccation by adult *Aedes (Stegomyia)* spp. (Diptera: Culicidae) from Indonesia. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 33, p. 53- 57, 1996.

MONATH, T. P. Yellow Fever. *In: The Arboviruses: epidemiology and ecology.* Boca Raton, CRC Press, v. 5, 1988, p. 139-231.

MONTEIRO, A. M. V. *et al.* **Saudavel:** Bridging the Gap between Research and Services in Public Health Operational Programs by Multi-Institutional Networking Development and Use of Spatial Information Technology Innovative Tools. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/saudavel/publicacoes.html> 2005>. Acesso: 05 jan. 2005.

MONTEIRO, L. C. C.; SOUZA, J. R. B.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Eclosion rate, development and survivorship of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) under different water temperatures. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 966-971, 2007.

MONTELLA, I. R. *et al.* Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MONTENEGRO, D. *et al.* Aspecto clínicos e epidemiológicos da epidemia de dengue no Recife, PE, em 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2006.

MORATO, V. C. G. *et al.* Infestation of *Aedes aegypti* estimated by oviposition traps in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, p. 553-558, 2005.

MORENO. **Secretaria de Saúde [Mapa de Moreno]**. Moreno, 2008. 1 figura.

MORENO. **Secretaria de Saúde Banco de dados do monitoramento de *Aedes aegypti* por Ovitrapas [período de 2002 a 2008]**. Moreno, 2008.

MULLA, M. S. Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies**. New Jersey: Rutgers University Press, 1990. p. 134-160.

MULLA, M. S., *et al.* Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 20, p. 64-73, 2004.

MUNSTERMANN, L. E. **The yellow fever mosquito**. 1995. 1 Fotografia. Disponível em: <http://www.novomilenio.inf.br/ano97/9704ccha.jpg>. Acesso: 10 jan 2008.

NAKAZAWA, M. M. **Abundância relativa de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em diferentes áreas do Recife**. 2006. 37 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **O Biológico**, São Paulo, vol 64, nº2, p. 205-207, 2002.

NAYAR, J. K. *et al.* Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 15, p. 32-42, 1999.

NOGUEIRA, R. M. R.; *et al.* Virologic study of Dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 210-225, 1988.

_____. Isolation of dengue vírus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 253, 1990.

_____. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

OBETA, J. A. N. Effect of inactivation by sunlight on the larvicidal activities of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* H-14 isolates from Nigerian soils. **Journal of Communicable Diseases**, Delhi, v. 28, p. 94-100, 1996.

OLIVEIRA, I. F. **Utilização de marcadores dominantes para estimar grau de parentesco em *Aedes aegypti***. 2005. 31 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade de Pernambuco, Instituto de Ciências Biológicas, Recife, 2005.

O'MEARA G. F. *et al.* Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 32, p. 554-562, 1995.

ORDONEZ – GONZALEZ, J. G.; MERCADO-HERNANDEZ, R.; FLORES-SUAREZ, A. E.; FERNÁNDEZ-SALAS, J. The use of sticky to estimate dispersal of *Aedes aegypti* in northeastern México. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 17, n. 2, p. 93-97, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**. Washington DC, 1995a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guidelines for dengue surveillance and mosquito control**. (Western Pacific Education in Actions Series No. 8). Geneva, 1995b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis***. **Environmental Health Criteria 217**. Geneva, 1999.

OSANAI, C. H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 1, p. 53-54, 1983.

PAIVA, M. H. S. **Monitoramento do gene que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil.** 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2006.

PERICH, M. J. *et al.* Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vector in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, p. 205-210, 2003.

PERNAMBUCO DE A/Z. **Recife. Climas e chuvas.** Disponível em: <http://www.pe-az.com.br/climas_chuva/climas_chuva.htm> Acesso: 22 out 2007.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global Situation of Dengue and dengue Haemorrhagic fever, and its Emergence in the Americas. **World Health Statistics Quarterly Rapport Trimestriel de statistique sanitaires Mondiales**, Geneve, v.50, n.3/4, p. 161-169, 1997.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, P. W. Frequency, diversity and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 44, p. 245-250, 2002.

PINHEIRO, V. C. S. *et al.* Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicida) captured in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 833-839, 2005.

POLSON, K. A. *et al.* The use of ovitraps baited with hay infusion as a surveillance tool for *Aedes aegypti* mosquitoes in Cambodia. **Dengue Bulletin**, Geneve, v. 26, p. 178-184, 2002.

PONCET, S. *et al.* Evaluation of synergistic interactions among the cryIVA, cryIVB, and cryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal Invertebrate Pathology**, New York, v. 66, p. 131-135, 1995.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETO, A. Dengue em localidade urbana da Região Sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

RAWLINS, S. C. *et al.* Comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trindade. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 14, p. 131-134, 1998a.

RAJU, A. Community mobilization in *Aedes aegypti* control programme by source reduction in Peri-urban distric of Lautoka, Viti Levu, Fiji Islands. **Dengue Bulletin**, Geneve, v. 27, p. 149-155, 2003.

RECIFE. Banco de dados do monitoramento de *Aedes aegypti* por Ovitrampas [período de 2001 a 2002]. 2008.

REGIS, L.; SILVA S. B.; MELO-SANTOS, M. A. V. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, p. 207-209, 2000.

_____. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

_____. 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, p. 50-59, 2008.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; COLON, N. Enhacement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 7, n. 1, p. 52-55, 1991.

REITER, P.; GUBLER, D. J. **Surveillance and control of urban dengue vectors**. In: Gubler, D. J.; Kuno G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International Publication; 1997, p. 45-60.

RITCHIE, S. A. *et al.* Effect of some animal feeds and oviposition substrates on *Aedes* oviposition in ovitraps in Cairns, Australia. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 17, n. 3, p. 206-208, 2001.

_____. An adulticidal sticky ovitrap for sampling container-breeding mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, p. 235-242, 2003.

_____. Entomological investigations in a focus of dengue transmission in Cairns, Queenslan, Australia, by usng the sticky ovitraps. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 41, n. 1, p. 1-4, 2004.

_____. A biodegradable lethal ovitrap for control of container-breeding *Aedes*. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 24, n. 1, p. 47-53, 2008.

RÍOS-VELASQUEZ, C. M. *et al.* Distributions 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, p. 617-623, 2007.

RODRÍGUEZ, M. M. *et al.* Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera; Culicidae) from Cuba and Venezuela. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 38, n. 5, p. 623-628, 2001.

ROMERO-VIVAS, C. M. E.; FALCONAR, A. K. I. Investigation of relationships between *Aedes aegypti* egg, larvae, pupae and adult density indices where their main breeding sites were located indoors. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 2, p. 15-21. 2005.

ROSENBAUM, J. *et al.* Community participation in dengue prevention and control: a survey of knowledge, attitudes, and practice in Trinidad and Tobago. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, p. 111-117, 1995.

RUSSELL, P. K. D. *et al.* Mosquito vectors of dengue viruses in south vietnam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 18, p. 455-459, 1969.

RUSSEL, R. C.; RITCHIE, S. A. Surveillance and behavioral investigations of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* in Moorea, French Polynesia, using a sticky ovitrap. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 20, n. 4, p. 370-375, 2004.

RUSSELL, R. C. [Larva de *Aedes*]. 2000. Disponível em:
<http://www.bioqmed.ufrj.br/ciencia/Bromelias/aedes_aegypti_larvae.jpg>. Acesso: 10 jan 2008.

SABROZA, P. C.; TOLEDO, L. M.; OSANAI, C. H. A organização do espaço e os processos endêmicos-epidêmicos. In: **Saúde, Ambiente e Desenvolvimento. Processos e Conseqüências sobre as Condições de Vida** (LEAL, M. C.; SABROZA, P. C.; RODRIGUEZ, R. H. & BUSS, P. M.). vol. 2, São Paulo: Editora Hucitec/Rio de Janeiro: ABRASCO, 1992. p. 57-77.

SANT'ANA, A. L.; ROQUR, R. A.; EIRAS, A. E. Characteristics of grass infusion as oviposition attractants to *Aedes (Stegomyia)* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 43, p. 214-220, 2006.

SANTOS, S. L. **Avaliação das ações de controle da dengue: aspectos críticos e percepção da população. Estudo de caso em um município do Nordeste.** 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2003.

SANTOS, R. C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 671-73, 2003.

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*. **World Health Organization Dengue Bulletin**, Geneve, v. 27, p. 156-162, 2003.

SANTOS, S. O.; NASCIMENTO, J. C. Primeiro registro da presença do *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 486, 1998.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 179-181, 2000.

SCHATZMAYR, H. G. *et al.* An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 245-246, 1986.

SCHOFIELD, C. Vector population responses to control intervention. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, v. 71, p. 201-217, 1991.

SERPA, L. L. N. *et al.* Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus* no município de Potim, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, p. 1101-1105, 2006.

SERVICE, M. **Medical Entomology: for students.** Cambridge. Cambridge University, 2004. P.285.

SETHA, T.; CHANTHA, N.; SOCHEAT, D. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis*, Vectobac® WG and DT formulations against dengue mosquito vectors in cement potable water

jars in Cambodia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 38, p. 261-268, 2007.

SHEERAN, W.; FISHER, S. W. The effects of agitation, sediment, and competition on the persistence and efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 24, p. 338-346, 1992.

SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMA DE CONTROLE DE FEBRE AMARELA E DENGUE (SISFAD). (Brasil). **Levantamento de Índices de infestação pelo *Aedes aegypti* (2000 a 2003)**. Jaboaão dos Guararapes, 2003.

SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMA DE CONTROLE DE FEBRE AMARELA E DENGUE. (SISFAD) (Brasil). **Levantamento de Índices de infestação pelo *Aedes aegypti* (2000 a 2003)**. Recife, 2008.

SISTEMA DE INFORMACAO DO PROGRAMA DE CONTROLE DE FEBRE AMARELA E DENGUE (SISFAD). (Brasil). **Levantamento de Índices de infestação pelo *Aedes aegypti* (2000 a 2003)**. Moreno, 2008.

SKOVMAND, O.; BAUDUIN, S. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in west African countries. **Journal of Vector Ecology.**, Santa Ana, v. 22, p. 43-51, 1997

SKOVMAND, O., *et al.* Parameters influencing potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products. **Journal of economic entomology**, College Park MD, v. 90, p. 361-369, 1997.

SKOVMAND, O.; THIÉRY, I.; BENZON, G. Is *Bacillus thuringiensis* standardization still possible?. In: CHARLES J-F; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 275-295.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência 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, V. C. *et al.* Diversidade de criadouros e tipos de imóveis freqüentados por *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1106-1111, 2006.

SILVA, E. V. G. **Uso de ovitrampas tratadas com biolarvicidas para o controle integrado do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em áreas urbanas do Recife.** 2006. 21 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

SITHIPRASASNA, R. *et al.* Field evaluation of a lethal ovitrap for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 40, p. 455-462, 2003.

SOTA, T.; MOGI, M. Survival time and resistance to desiccation of diapause and non diapause eggs of temperate *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 63, p. 155-161, 1992a.

_____. Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes* (*Stegomyia*) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. **Oecologia**, Berlin, v. 90, p. 353-358, 1992b.

SOUZA-SANTOS, R. Fatores associados à ocorrência de formas imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, p. 373-382, 1999.

SPIEGE, J.; YASSI, A.; TATE, R. Dengue in Cuba: mobilization against *Aedes aegypti*. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p. 207-208, 2002.

STOOPS, C. A. Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 30, p. 41-44, 2005.

STOTZ, E. N. Enfoques sobre educação e saúde. In: VALLA, V.V; STOTZ, E.N. **Participação popular, educação e saúde, teoria e prática.** Rio de Janeiro, Relume-Dumará, 1993.

SUPERINTENDÊNCIA DE CAMPANHAS DE SAÚDE PÚBLICA (Brasil). **Relatório do Seminário sobre dengue e *Aedes aegypti*** – Região Nordeste, 06 a 10 de junho de 1988, Recife, PE.

SWADDIWUDHIPONG, W. *et al.* Effect of health education on community participation in control of dengue hemorrhagic fever in an urban area of Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, vol. 23, p. 200-206, 1992.

TABACHNICK, W.; POWELL, J. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Genetics**, Autin, v. 34, p. 215-229, 1979.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemics in a complex urban area. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 7, p. 757-762, 2002.

_____. Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Sao Paulo, v. 5, p. 108-115, 2002.

_____. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 1307-1315, 2005.

THIÉRY, I.; FOUQUE, F. Application of *B. thuringiensis* ser. *israelensis* in French Guyana against *Aedes aegypti* dengue vector. **Acta Parasitol. Portuguesa**, v.5, p. 48, 1998.

THIÉRY, I. *et al.* Residual activity of *Bacillus thuringiensis* serovars *medellin* and *jegathesan* on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 15, p. 371-379, 1999.

TIDWELL, M. A. *et al.* Baseline data on *Aedes aegypti* populations in Santo Domingo, Dominican Republic. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 6, p. 514-522, 1990.

TOLEDO-ROMANI, M. E. *et al.* Participación comunitaria en la prevención del dengue: un abordaje desde la perspectiva de los diferentes actores sociales. **Salud Publica de México**, México, v. 48, p. 39-44, 2006.

TOMA, L. *et al.* Seasonal patterns of oviposition and egg hatching rate of *Aedes albopictus* in Rome. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 1, p. 19-22, 2003.

TSUDA, Y. *et al.*, Movement of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) released in a small isolated village on Hainan Island, China. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 38, n. 1, p. 93-98, 2001.

TUN-LIN, W.; KAY, B. H., BARNES, A. Understanding productivity, a key *Aedes aegypti* surveillance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, n. 6, p. 595-601, 1995.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. **Armadilha contra dengue tranquiliza organizadores do Pan-americano**. Disponível em:

<http://www.ufmg.br/online/arquivos/006105.shtml> Acesso: 10 jul 2007.

VALLA, V. V. Sobre a participação popular: Uma questão de perspectiva. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p.7-18, 1998.

VARGAS, M. V. Uso de ovitrampas en los programas de prevención y control del dengue. **Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos**. Costa Rica, v. 8, n. 3, p. 122-124.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro epidemiológico aleatório. **Revista de Saúde Pública**, Sao Paulo, v. 32, n. 5, p. 447-454. 1998.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Inquérito soro-epidemiológico na Ilha de São Luís durante epidemia de dengue no Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 171-179, 1999.

VAZEILLE, M. *et al.* Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, p. 491-497, 2001.

VEZZANI, D.; VELASQUEZ, S. M.; SCHWEIGMANN, N. Seasonal pattern of abundance of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 351-356, 2004.

VIEIRA, G. J. [pupa de *Aedes*]. Disponível em:

http://www.fiocruz.br/ioc/media/pupa1_genilton_280308.jpg. acesso em: 10 jan 2008.

VILARINHOS, P. T. R.; MONNERAT, R. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 20, p. 311-314, 2004.

ZEICHNER, B.C.; PERICH, M.J. Laboratory testing of a lethal ovitrap for *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 13, p. 234-238, 1999.

WILLIAMS, C. R. *et al.* Field efficacy of the BG-sentinel compared with CDC backpack aspirators and CO²-baited traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, p. 296-300, 2006a.

_____. Optimizing ovitrap use for *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia: effects of some abiotics factors on field efficacy. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 4, p. 635-640, 2006b.

_____. Impact of a bifenthrin-treated lethal ovitrap on *Aedes aegypti* oviposition and mortality in north Queensland, Australia. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, p. 256-262, 2007.

WINCH, P. *et al.* Beliefs about the prevention of dengue and other febrile illness in Mérida, Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 94, p. 377-387, 1991.

APÊNDICES

Apêndice A – Manuscrito para publicação

Para: Biological Control

Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling.

Maria Alice Varjal de Melo Santos¹; Ana Paula de Araújo¹; Eugênia Maria Maranhão Rios²; Lêda Regis¹

¹Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Caixa Postal 4742, CEP: 50670-420. ²BIOTICOM – Biotecnológica Industria e Comércio. Recife, PE, Brasil.

Maria Alice Varjal de Melo Santos
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz
Departamento de Entomologia
Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária
Campus da UFPE, Recife, PE
CEP: 50.670-420
E-mail: mavarjal@cpqam.fiocruz.br

1. Introduction

The discovery of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (Bti) toxicity against dipteran larvae (Goldberg and Margalit, 1977; De Barjac, 1978) and its utilization, a few years later, in vector control programs (Becker and Rettich, 1994; Hougard et al., 1997, Mardini et al., 2000), has marked the history of disease vector control (Regis et al., 2001). More than two decades later, a solid amount of knowledge has been accumulated on Bti that confirms, among other things, its safety upon continuous large-scale application. Another relevant fact about Bti is that, after being utilized for more than two decades in the field, no resistance has been detected in target insects exposed to this biolarvicide. However, data about the persistence of Bti larvicidal activity in aquatic habitats colonized by *Aedes aegypti* are still contradictory, since results show persistence records ranging from one week to six months (Mulla et al., 2004; Benjamin et al., 2005; Lima et al., 2005a; 2005b; Armengol et al., 2006; Araújo et al., 2007; Setha et al., 2007). This variation has been attributed to many factors, such as the type of larval breeding site, characteristics of the formulation and sun exposition (Becker et al., 1992; Nayar et al., 1999; Lima et al., 2005a; 2005b; Araújo et al., 2007).

Currently, there are more than a dozen industrialized Bti products available in the market, found in different formulations. The majority of these products contain bacterial spores and crystals as the active components (Becker, 2000; Couch, 2000). Since 1991, the use of these products in potable water has been considered safe by WHO (WHO, 1999), however, a few countries such as Germany, have utilized products based on unviable spores for culicine control programs (KABS) (Becker et al., 1991; Becker 2002). In these cases, the use of unviable spores formulations is to ensure environmental safety, required by local laws, and to make these type of insecticides more acceptable by the population (Becker, 2002). The limitations on the use of formulations based on unviable spores lie on the high cost for their production and the possible loss of products toxicity, due to the methods utilized to prepare them (Becker, 2002; Couch, 2000). Importantly, a possible extra disadvantage of such products would be the lack of any recycling activity, present only when viable spores exist.

Our study aims to evaluate the recycling capacity of Bti in *A. aegypti* breeding containers treated with an experimental product containing either viable spores or high percentage of inactivated spores. Additionally, the influence of other variables such as larval density, spores

concentration and water replacement on the persistence of Bti larvicidal activity under simulated field conditions is evaluated.

2. Material and Methods

Insects: first (L1) or fourth (L4) larval instars of *Aedes aegypti* originated from the Recife laboratory colony (RecL strain) were utilized in the experiments. This colony has been maintained in the insectary of CPqAM/FIOCRUZ since 1996 under standard conditions: $26^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 65-85% relative humidity, 12/12 light/dark cycle. Larvae were daily fed with sterile homogenized cat food (Whiskas®).

Bti product: two formulations of an experimental product based on Bti-IPS82 were tested: tablet and technical powder. Both formulations contained potency of 750 ITU/mg, weighed 250 mg and possessed 15% (w/w) of the active ingredient (AI). This material was produced by Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM).

Inactivation of spores by gamma radiation: To get the irradiated-technical powder, five samples containing 2 g of technical powder received the following treatments: 0 (control), 16, 18, 20, and 30 Kilogray (KGy) of gamma radiation, for a maximum period of 7.5 h. For samples irradiation, a cobalt 60 source in the NordionGammacell 220 irradiator was used, located at the Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). To verify the effect of different gamma radiation doses upon Bti spores viability, two samples of 100 μl from a 100 mg/ml solution of each irradiated product were plated in nutritive agar media (NA). Plates were incubated at 30°C for 24 h, according to the protocol described by Becker (2002). The microbiological viability of irradiated samples was determined by the number of bacteria colonies in plates, expressed as colony-forming units (CFU/ml). The relation of CFU/ml with the radiation dose was analyzed by linear regression (Software R, versão 2.1.1).

Evaluation of gamma radiation effects upon larvicidal activity: the toxicity of irradiated samples was estimated through bioassays performed according to the methodology described by De Barjac and Larget-Thiéry (1984) for Bti. Homogeneous groups of L4 larvae were put in

plastic cups containing 100 ml of distilled water and treated with seven different concentrations of irradiated products. Each concentration was tested in triplicate. Three cups containing larvae received no treatment and served as the control group. These assays were repeated three times. The larval mortality observed at 24 h upon pathogen exposure was used to obtain the lethal concentrations for 50% (LC₅₀) and 90% (LC₉₀) of larvae by linear regression log-Probit (SPSS 8.0 for Windows, 1997). The relation between LC₅₀ and gamma radiation dose was also analyzed by linear regression considering a 5% significant level.

Trials under simulated field conditions (SFC): the products were tested according to the methodology described by Melo-Santos et al. (2001). Experiments were performed under the shade, inside a greenhouse (96 m²). Transparent plastic containers (56.4 x 38.5 x 37.1 cm) covered with screened lids were filled with 50 L of tap water and treated with one tablet or 250 mg of the technical powder or irradiated-technical powder. Each experiment was carried out in triplicate and 3 containers were left untreated as a control. The temperature and water pH were registered 3 times per week.

Effects of variables upon bacterial recycling: Larval density and presence of active or inactivated spores were evaluated as variables upon bacterial recycling. To evaluate larval density effects, a batch of 50 L1 larvae was introduced in test containers treated with tablet, either weekly or monthly. In this case there was no water replacement. The effects of active or inactivated Bti spores were tested in containers treated with technical powder or irradiated-technical powder. For that, a batch of 50 L1 larvae was introduced weekly in each recipient and 20% of the water volume was replaced 3 times per week. In this case, water was flowed out of the containers through a jacket, and the same volume of fresh water was added back, as described by Araujo et al. (2007).

Follow-up of larvicidal activity under SFC: the larvicidal activity was evaluated through the following parameters: a) initial efficacy – estimated by larval mortality in the first 48 h after product application, with the introduction of 50 young L4 per container; b) persistence – defined as the period (days) in which larval mortality was $\geq 80\%$ and estimated by the number of live pupae recovered after introduction (weekly or monthly) of 50 L1 per container. For results

analysis, the nonparametric Mann Whitney test for two samples was used through SPSS 8.0 for Windows (1997), considering a 5% significant level.

Determination of Bti spores concentration in treated containers: spores were counted periodically in samples taken from containers treated with technical powder or irradiated-technical powder in order to monitor the bacterial growth. In recipients treated with tablet that received a batch of L1 weekly or monthly, the spore concentration surveillance was aimed at investigating the influence of different amount of dead larvae on Bti growth. Samples of 5 ml of water were collected from 3 different spots of the bottom of containers at 24 h, 7 days, and 30 days after Bti application. When necessary, the samples were serially diluted before the thermal shock at 80°C for 12 min, used to eliminate vegetative forms. Samples of 5 µl of the 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} or 10^{-3} suspensions were plated in 5 distant places in a Petri dish containing nutritive agar and incubated at 30°C for 24 h. Bti colonies were counted and the results, transformed in colony-forming units (CFU/ml), were analyzed through the program DIFMED. The average of CFU/ml obtained in different time points was compared through student's *t*-test, with a 5% significant level.

3. Results

Effects of gamma radiation upon Bti toxicity and spores viability

Regression analysis of spores viability in samples treated with 16, 18, 20 e 30 KGy of gamma radiation revealed a negative correlation between the amount of viable spores and radiation dose ($r = -0.9$) (Fig.1 and Table 1). The two highest doses reduced 99.9% of viable spores. Bioassays against L4 larvae showed that the gamma radiation caused a 20-83% lost of larvicidal activity, when compared to the LC_{50} (0.26 mg/L) of the non-irradiated material (Table 1). This reduction in toxicity was clearly dose-dependent ($r = 0.77$) (Fig.1).

The SFC were performed with samples treated with 20 KGy of gamma radiation, since this was the dose that caused the largest reduction in viable spores (99.9%) combined with the least reduction in larvicidal activity (Table 1), with a mean LC_{50} of 0.45 ± 0.07 mg/L. The irradiated-technical powder caused 90% of larval mortality at 24 h after treatment, which was not much

lower than mortality caused by technical powder (98%). On the 7th day after the single treatment, both technical powder and irradiated-technical powder promoted 100% of larval mortality that lasted until the end of the experimental period, i.e. 180 days.

One day after the beginning of the experiment, spores concentration in containers treated with the technical powder was around 5×10^5 CFU/ml (Fig. 2). At the 7th day there was a discrete reduction, however the numbers remained higher than 1×10^4 CFU/ml in the following 6 months. In containers treated with irradiated-technical powder, no Bti colonies were detected in samples collected at 24 h post-treatment (Fig. 2). From the 7th day on, however, the presence of viable spores was registered in all replicates and at all time points, at concentrations between 2×10^2 and 7×10^2 UFC/ml (Fig. 2). The bacterial concentration observed in these containers was, in most cases, significantly lower than in the containers treated with technical powder ($p < 0.05$), however spores concentration at 90 and 150 days after treatment was not significantly different between technical powder and irradiated-technical powder ($T=3.2$ and 3.0 , respectively; $p > 0.05$).

Along the experiment, water temperature in containers varied between 26.3°C and 29.8°C , and the pH between 6.9 and 8.4.

Effects of the frequency of larval colonization

Persistence of larvicidal activity of tablet, with weekly or monthly larval introduction, lasted for at least 180 days, causing 100% larval mortality. This high larvicidal activity was observed during the entire experimental period and was independent of the amount of larvae introduced in the containers.

There were no significant differences ($p > 0.05$) in spores concentration between containers colonized with different amounts of larvae (Fig. 3). One day after application of tablet, spores concentration was 1.3×10^2 and 7.9×10^1 CFU/ml in containers with weekly or monthly larval introductions, respectively. In both groups, CFU/ml increased at 7 days post-treatment, decreased at the end of one month, and started increasing again along 60 days, remaining elevated (1.2×10^4 UFC/ml to 2.8×10^4 UFC/ml) until 6 months after treatment (Fig. 3).

4. Discussion

Experiments conducted with Bti technical powder and tablet under simulated field conditions indicated the long persistence of the residual larvicidal activity of these products

against *A. aegypti* larvae. This was concomitant with elevated concentrations of viable bacterial spores during 6 months after a single Bti treatment in recipients periodically colonized with L1 larvae, kept in the shade, and with or without periodic water replacement.

The application of a single dose of 250 mg of technical powder, or a tablet in 50 L of water resulted in a sustained concentration of Bti spores, always higher than 10^4 CFU/ml, and capable of causing the mortality of all larvae introduced in the containers along 180 days after treatment. Although similar doses of technical powder and tablet were used, clearly there were differences between the two treatments regarding the evolution of spore concentration during the first month after product application. In containers treated with technical powder, the highest spore concentration was detected 24 h post-treatment, decreasing at 7 days, and stabilizing at around 10^4 CFU/ml from the 30th day to 6 months. In the case of tablet, as the active principle is aggregated and thus released slowly, spore concentration in containers treated was the lowest at 24 h and fluctuated during the first month. From the 60th day on, it stabilized and was similar to the one observed in technical powder treated recipients. The increase in bacterial concentration in the period between 30 and 180 days after treatment clearly shows bacterial recycling, since at 180 days post-treatment this concentration was 100 times higher than the one observed at 30 days.

It is important to point out that although there were differences in the initial spore concentrations, there was 100% of larval mortality from 24 h to 180 days post-treatment, independent of the product formulation. These results show Bti recycling, i.e. bacterial growth and production of toxins in the trophic zone of *A. aegypti* larvae.

Becker (2002) demonstrated that the total inactivation of spores, obtained through a 20.6 KGy radiation dose, caused a 20% loss on product's toxicity, however he did not analyze persistence. Here, albeit 100% of spores inactivation was not achieved (and this was necessary to show recycling activity), a significant loss in product toxicity was also observed. A comparison of Bti larvicidal persistence between a partially-inactivated sample (such as the one used here) and a total-inactivated product would be interesting to pursue.

The results obtained with irradiated-technical powder reinforce that bacterial recycling occurred: when the formulation containing only 0.1% of active spores was used, no bacterial growth was detected in the containers 24 h later, however, from the 7th day to the 6th month post-treatment spores concentration was 10^2 to 10^3 CFU/ml, with sustained total larval control.

The influence of recycling activity on product's persistence after the 6th day of exposure on *B. sphaericus* was also demonstrated by Becker (1995).

The recycling capability of entomopathogenic bacteria of the *Bacillus* genera, especially *B. sphaericus*, in culicid habitats was documented in the 1980s (Nicolas et al., 1987), and its contribution on the persistence of products larvicidal activity under laboratory conditions was demonstrated in the 1990s (Becker, et al., 1995). In one of the few studies about Bti recycling, Aly et al. (1985) estimated that at 72 h after Bti ingestion, one dead *A. aegypti* L4 may contain 7×10^4 to 14×10^4 bacterial spores. The observation that toxins produced by recycling events with complete sporulation cycle do not always reach the areas where larvae feed, led to a decreasing interest on the subject. It is important to note that the lack of contact between live larvae and bacteria that multiply and remain at the bottom of habitats, is certainly frequent in the case of *Culex*, which feed in the water surface. However, *Aedes* larvae feed more frequently at the bottom and walls of containers, thus the ingestion of toxins originated from recycling events is easier to occur.

Since *B. sphaericus* and Bti multiply inside dead mosquito larvae, one can expect that larval density in containers treated with these bacteria has influence in the recycling process. In our experiments where *Aedes* larvae were introduced in containers either weekly (sum of 1,200 larvae/container in 6 months) or monthly (300 larvae/container in 6 months), there was 100% of larval control during the 6 month observation period, and the bacterial concentration was similar between the two groups, independent of the larval density. Why was not spore concentration higher in containers that received 4 times more larval cadavers? Although there is not a clear explanation, our data suggest that 300 dead larvae per container were sufficient to warrant enough recycling to cause 100% larval control, and that environmental factors in the habitats possibly acted as bacteria population size regulators. Becker et al (1995) also showed that there was not a clear influence of *Culex pipiens* larval density on *B. sphaericus* spores concentration. Studies performed under laboratory and field conditions showed that in environments with high larval density, a larger amount of bacterial product would be necessary to cause 100% larval control, indicating the density of target species larvae as one of the factors that negatively influence larvicidal activity of bacterial products (Mulla, 1990; Becker et al., 1992; Nayar et al., 1999). In this way, it is possible that the larger amount of bacteria being produced by recycling events in the densest containers is being more intensely ingested by recently introduced larvae.

Here, as in previous studies (Melo-Santos et al., 2001, Araújo et al., 2007), L1 were utilized instead of L4 for experiments on the persistence of Bti toxicity in simulated field conditions. This is important because firstly, it simulates the natural field reality, and secondly L1 are more sensitive to Bti, thus the tests themselves turn out more sensitive (Melo-Santos et al., 2001). It seems increasingly clear that experimental conditions to evaluate biological larvicides must approximate natural field conditions in which the larvicides will be used. The removal of dead larvae in treated recipients (e.g. for counting) is a common procedure that impedes recycling events to occur, and may interfere on larvicidal activity of Bti and other entomopathogenic bacteria, as demonstrated with *B. sphaericus* by Becker et al. (1995). Another common practice that may bias analysis of Bti persistence is to stop the experimental evaluation once larval mortality reaches a pre-established level, often 70% or 80%. We have recently shown that after decreasing to at least 70%, Bti toxicity may start increasing again and reach 100%, remaining sustained for weeks and possibly reflecting bacterial growth (Araújo et al., 2007). A similar pattern was observed by Armengol et al. (2006), suggesting that recycling may contribute to an extended larvicidal activity of such products. Persistence of up to 4 months has been observed in studies carried out by different research groups that take in consideration the biotic aspects of this larvicide in the experimental design (Mulla et al., 2004; Benjamin et al., 2005; Armengol et al., 2006; Setha et al., 2007; Araújo et al., 2007).

During our experiments, a question was raised on the amount of larvae introduced in the containers: maybe recycling events were occurring because of the higher than natural amount of larvae introduced in the containers, thus not reflecting a natural situation. Recent studies on *Aedes* population surveillance in urban Brazilian environments have shown elevated infestation levels, accompanied by elevated population densities (Ríos-Velasquez et al., 2007; Maciel-de-Freitas et al., 2007, Regis et al., 2008). In Recife-PE, the spatio-temporal surveillance of *Aedes* with the use of 464 ovitraps showed that more than 1,000 eggs are frequently collected per house in one month (Regis et al., 2008). In these circumstances, the introduction of 50 or 200 *Aedes* larvae per month in a test container, performed here, does not seem to be too far from what happens in nature.

The results presented here, in addition to other studies published in the past few years, reassure that Bti products are the best larvicides currently available against *Aedes* spp. for a number of reasons: no resistance to these products have been identified; they can also function as

an oviposition stimulant (Santos et al., 2003; Stoops, 2005); and when used in recipients protected from the sun, as is the case of most indoor *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* breeding sites, the larvicidal activity may persist for many months promoting total larval control. However, one must bear in mind that the use of Bti or any other larvicide as the only control measure may not be enough to warrant the sustained control of *Ae. aegypti* population density and must be integrated with other vector control measures (Regis et al., 2008).

Acknowledgments

To the Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM), for donating the experimental product utilized in this study and to allow results dissemination. To Dr. Maria Helena O. Sampa and Paulo Rela from the Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), for irradiating the experimental product. To the Pasteur Institute for providing the IPS82 sample, a standard lyophilized product based on *Bacillus thuringiensis israelensis*. To the Zoology Department at UFPE, for allowing us to use the greenhouse for simulated field conditions experiments. To Dr. Tereza Magalhães for critical reading of manuscript and helpful comments. To FIOCRUZ/PDTSP-RD-VE-03 and CAPES, for the financial support.

References

- Aly, C., Mulla, M.S., Federici, B.A., 1985. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera:Culicidae). *Journal Invertebrate Pathology* 46, 251-258.
- Araújo, A.P., Santos, M.A.V.M., Carlos, S.O., Rios, E.M., Regis, L.N., 2007. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera:Culicidae). *Biological Control* 41, 339-347.
- Armengol, G., Hernandez, J., Velez, J.G., Orduz, S. 2006. Long-lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. *Journal of Economic Entomology* 99, 1590-1595.

- Becker, N., Djakaria, S., Kaiser, A., Zulhasril, O. and Ludwig, H.W., 1991. Efficacy of a new tablet formulation of an asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. Bulletin of the Society Vector Ecology 16, 176-182.
- Becker, N., Zgomba, M., Ludwig, M., Petric, D., Rettich, F., 1992. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. Journal American Mosquito Control Association 8, 285-289.
- Becker, N., Rettich, F., 1994. Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. Journal American Mosquito Control Association. 10, 527-533.
- Becker, N., Zgomba, M., Petric, D., Beck, M., Ludwig, M. 1995. Role of larval cadavers in recycling processes of *Bacillus sphaericus*. Journal American Mosquito Control Association 11, 329-334.
- Becker, N., 2000. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J-F., Delécluse, A. and Nielsen-Leroux, C. (Eds), Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 383-396.
- Becker, N., 2002. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. Journal American Mosquito Control Association 18, 57-62.
- Benjamin, S., Rath, A., Fook, C.Y., Lim, L.H., 2005. Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation, vectobac DT, for control of dengue mosquito vectors in potable water containers. Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health. 36, 879-892.
- Couch, T.L., 2000. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: Charles, J-F., Delécluse, A. and Nielsen-Leroux, C. (Eds), Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 297-314.
- De Barjac, H., 1978. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* sérotype H14. Comptes Rendus Académie Sciences 286, 297-314.
- De Barjac, H., Larget-Thiery, 1984. Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Mimeographed document WHO/VBC/84.892. World Health Organization, Geneva, 10 pp.

-
- Goldberg, L.; Margalit, G.A., 1977. Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*. Mosquito News 37, 355-358.
- Hougard, J.M., Yameogo, L., Sékétéli, A., Boatin, B., Dadzie, K.Y., 1997. Twenty-two Years of Blackfly Control in the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. Parasitology Today 13, 425-31.
- Lima, J.B.P., Melo, N.V., Valle, D. 2005a. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 47, 125-130.
- Lima, J.B.P., Melo, N.V., Valle, D. 2005b. Persistence of Vectobac WDG and Metoprag S-2G against *Aedes aegypti* larvae using a semi-field bioassay in Rio de Janeiro, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 47, p. 7-12.
- Maciel-de-Freitas, R., Marques, W.A., Peres, R.C., Cunha, S.P., Lourenço-de-Oliveira R., 2007. 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 102, 489-496.
- Mardini, L.B., Torres, M.A., da Silveira G.L., Atz, A.M., 2000. Simulium spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95, 211-214.
- Melo-Santos, M.A.V., Sanches, E.G., Jesus, F.J., Régis, L.N., 2001. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96, 859-860.
- Mulla, M.S., 1990. Activity, field efficacy and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. In: de Barjac, H. and Sutherland, D. J. (Eds), Bacterial control of mosquitoes and black flies, New Brunswick, NJ: Rutgers Univ. Press, pp. 134-160.
- Mulla, M.S., Thavara, U., Tawatsin, A., Chomposri, J., 2004. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. Journal American Mosquito Control Association 20, 64-73.

- Nayar, J.K., Knight, J.W., Aly, A., Carlson, D.B., O'Bryan, P.D., 1999. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors the may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. Journal American Mosquito Control Association 15, 32-42.
- Nicolas, L., Dossou-Yovo, J., Hougard, J.M., 1987. Persistence and recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa. Applied Microbiology Biotechnology 25, 341-345.
- Regis L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends in Parasitology 17, 377-380.
- Regis, L., Monteiro, A. M., Melo-Santos, M. A. V., Silveira-Júnior, J. C., Furtado, A. F., Acioli, R. V., Santos, G. M., Nakazawa, M. M., Carvalho, M. S., Ribeiro-Jr, P. J., Souza, W. V. 2008. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103, 50-59.
- Ríos-Velasquez, C.M., Codeço C.T., Honório N.A., Sabrosa P.S., Moresco M., Cunha I.C.L., Levino A., Toledo L.M., Luz S.L.B., 2007. Distributions of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102: 617-623.
- Santos S.R.A., Melo-Santos M.A.V., Regis L, Albuquerque C.M.R., 2003. Field evaluation of ovitraps consociated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis* var.*israelensis* to determine oviposition rates. Dengue Bulletin 27: 156-162.
- Setha T., Chantha N., Socheat D., 2007. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis*, Vectobac® WG and DT formulations against dengue mosquito vectors in cement potable water jars in Cambodia. Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health 38, 261-268.
- Stoops C.A., 2005. Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). Jounal Vector Ecology 30, 41-44.
- WHO [World Health Organization], 1999. Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. Enviromental Health Criteria 217. Geneva, Switzerlans: World Health Organization.

Table 1. *Bacillus thuringiensis israelensis* toxic activity measured through bioassays against *Aedes aegypti* larvae, and viable spores concentration of the gamma-irradiated Bti-technical powder.

Radiation dose (KGy)	Number of viable spores (CFU/ml) ² ± SD ³	LC ₅₀ ⁴ (mg/L) (95% confidence interval)	Toxicity loss (%)
0 ¹	4,400,000,000 ± 148.49	0.26 (0.168-0.344)	0
16	40 ± 14.14	0.30 (0.251 – 0.379)	14.4
18	20 ± 14.14	0.38 (0.314 – 0.470)	31.5
20	5 ± 7.0	0.45 (0.314 – 0.432)	42.2
30	5 ± 7.0	1.41 (1.28 – 1.58)	81.6

0¹ = non-irradiated sample (control);

²CFU= colony-forming unit;

³Standard deviation;

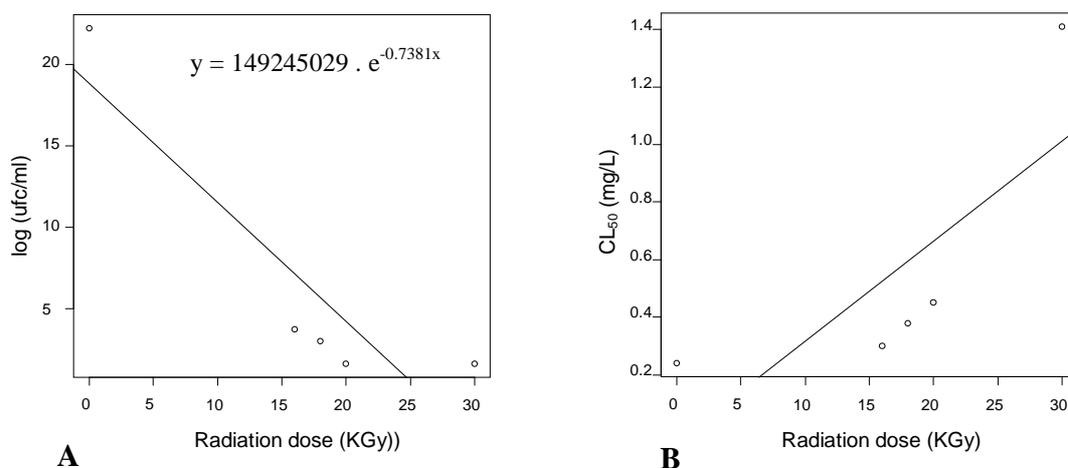
⁴CL₅₀= Lethal concentration for 50% of larvae.

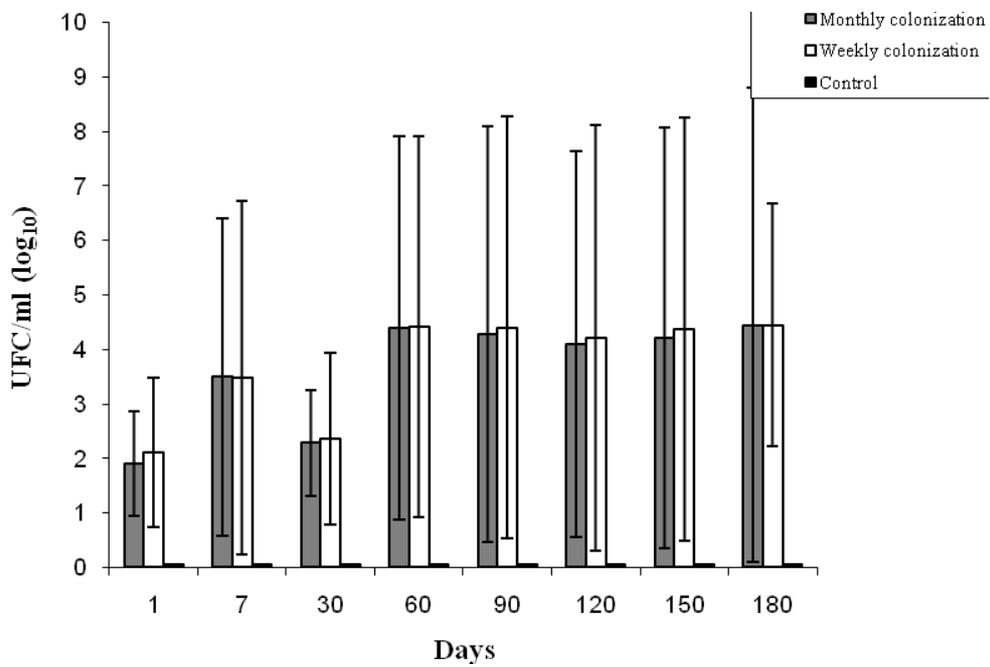
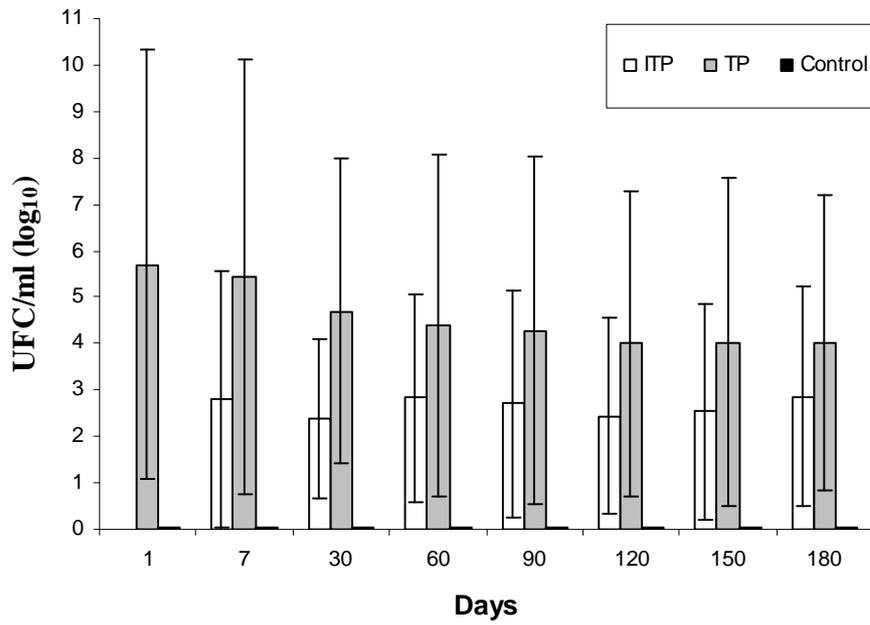
Figure legends

Figure 1. Relation between different gamma radiation doses and spores viability (A) and toxicity (B) of an experimental technical powder of *Bacillus thuringiensis israelensis*, evaluated by bacterial colony-forming units (CFU/ml), and lethal concentrations (LC₅₀) obtained in bioassays against *Aedes aegypti* larvae.

Figure 2. Concentration of viable *Bacillus thuringiensis israelensis* spores in recipients treated with the technical powder of an experimental product, containing either active (TP) or irradiated (ITP) (20 KGy of gamma radiation) spores. Samples were taken from assays under simulated field conditions using *Aedes aegypti* larvae from a laboratory colony. Recipients were protected from the sun and 20% of water was replaced 3 times per week.

Figure 3. Concentration of viable spores in recipients treated with a tablet of the experimental product based on *Bacillus thuringiensis israelensis*. Containers were maintained under the shade with no water replacement. Weekly or monthly introduction of *Aedes aegypti* larva was performed.





Apêndice B – 1º Artigo publicado



Available online at www.sciencedirect.com



Biological Control 41 (2007) 339–347

Biological
Control

www.elsevier.com/locate/ybcon

Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera:Culicidae)Ana Paula de Araújo^a, Maria Alice Varjal de Melo-Santos^{b,*}, Sidney de Oliveira Carlos^b, Eugênia Maria Mariz Maranhão Rios^c, Lêda Regis^b^a Mestrado em Biologia Animal, Departamento de Zoologia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Moraes Rego, 1235, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil^b Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Caixa Postal 4742, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil^c BIOTICOM – Biotecnológica Indústria e Comércio LTDA, Recife, PE, Brazil

Received 4 September 2006; accepted 6 March 2007

Available online 14 March 2007

Abstract

The larvicidal activity of an experimental formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) against *Aedes aegypti* larvae was evaluated under laboratory and simulated field conditions (SFC). Samples of technical powder (TP) were assayed to establish the LC₅₀ and the potency of the product. The larvicidal activity of the TP and the tablet (T) were evaluated under SFC to assess the efficacy and the residual activity, measured against *Ae. aegypti* larvae. Either a T or 250 mg of TP were added to 50 L of water in plastic containers. Containers were exposed to sunlight or kept in the shade. Results showed a LC₅₀ of 0.26 mg/L and a potency of 750 ITU/mg. In spite of differences in the toxicity amongst TP and T samples, all of them killed 98–100% of the larvae and the mortality remained high for six months, in the shade. The replacement of 20% or 60% of the water volume did not affect the activity of the product. Seasonal differences influenced the persistence of the product in containers exposed to sunlight. Both formulations showed an excellent performance, especially when kept in the shade. The Bti tablet evaluated in this study is potentially very useful in programs to control dengue vectors. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Entomopathogenic bacteria; Bti; Tablet formulation; Semi field test; Mosquito control

1. Introduction

About two hundred microbial products for insect control are currently on the market, 50% of them based on *Bacillus* entomopathogenic bacteria (Alves et al., 1998). These microbial agents are the most widely used around the world for integrated pest management (IPM), especially to control the lepidopterans and coleopterans species. Effective control of aquatic larvae such as those of mosquitoes and black flies, have been achieved using *Bacillus sphaericus* (Bs) and *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (Ruas Neto, 1984; Hougard et al., 1997; Mardini et al., 2000; Regis et al., 2001). During sporulation, Bti produces pro-

tein crystals with insecticide activity (delta-endotoxins), composed of four major protoxins Cry4A, Cry4B, Cry11A and CytA. Its mode of action involves ingestion and solubilization of crystals followed by the cleavage of protoxins, activation of toxins and interaction with the cells of the midgut epithelium of susceptible larvae (Gill et al., 1992). These toxins act synergistically to produce full toxicity, thereby making it difficult to select insect populations resistant to this entomopathogen. This fact has been demonstrated in a program to control floodwater and snowmelt species of mosquito in Germany, a country that has been using Bti since 1980 (Becker and Ludwig, 1993). Bti is a highly selective insecticide for controlling culicidae and simuliidae larvae. This offers the additional advantage of not affecting non-target species of vertebrates and invertebrates, thereby ensuring the safety of its prolonged use on a large scale, without damaging the environment (Guillet

* Corresponding author. Fax: +81 3453 2449.
E-mail address: mavarjal@cpqam.fiocruz.br (M.A.V. de Melo-Santos).

et al., 1990; Mardini et al., 2000; Regis et al., 2000; Regis et al., 2001; Lima et al., 2003). Since 2001, larvicides based on Bti have been used in Brazil, as part of the National Program of Dengue Control, as an alternative for management of resistance to temephos, an organophosphate insecticide, in *Aedes aegypti* (Linnaeus) populations. Temephos has been continuously used in Brazil for mosquito control since 1986 (Macoris et al., 1999; Fundação Nacional de Saúde, 2002; Macoris et al., 2003).

The production and formulation of Bti have been improved to attain the desired effect of larvae control in a variety of breeding sites. Apart from factors related to maintenance of the viability of the microorganism during fermentation, biomass concentration and recovery of the phases, the final processing of the formulation is extremely important for obtaining an efficient and viable product as far as the cost of production is concerned. Although liquid suspension is the least expensive formulation, it is also relatively unstable compared to dry formulations, because the active ingredient is very vulnerable to environmental adversities (Couch, 2000). In addition, recent researches have demonstrated that solid products with slow release of the active ingredient are more suitable for *Ae. aegypti* control (Becker, 2000; Melo-Santos et al., 2001).

Early evaluations of Bti products indicated variations of persistence of larvicidal activity between 1 and 3 weeks, depending on the environmental conditions where the product was applied, suggesting the need for frequent applications (Hougard et al., 1997; Mulla, 1990; Becnel et al., 1996; Batista Filho et al., 1998). New formulations more appropriate for typical breeding sites and the feeding behavior of the larvae have achieved increased persistence, resulting in economic, environmental and operational advantages (Becker and Rettich, 1994; Melo-Santos et al., 2001). For better field performance of the Bti, new products are continually being developed, in the search for greater stability, storage time, ease of handling, and operational use without loss of quality (Couch, 2000). The present study reports the evaluation of an experimental tablet formulation of Bti for *Ae. aegypti* larvae control under laboratory and simulated field conditions.

2. Materials and methods

2.1. Mosquito

Aedes aegypti larvae from a Recife-Lab colony kept in the Department of Entomology CPqAM/FIOCRUZ since 1996 were used. The breeding conditions were $26 \pm 2^\circ\text{C}$, RH from 65% to 85%, photoperiod 12/12 (L/D), larvae were fed daily with sterilized, macerated cat food (Whiskas®).

2.2. Bti experimental product

For this study, samples of technical powder (TP) and a tablet (T) containing 15% (w/w) of active ingredient (AI) from different production lots of *Bacillus thuringiensis israel-*

ensis (Bti) strain IPS82, were provided by Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda (BIOTICOM). The production process involved the use of bacterial growth medium containing mineral salts, glucose and corn steep liquor, and the discontinued immersed fermentation (batch). The culture was produced in a fermentator type agitator and the biomass was recovered using the flocculation/sedimentation technique to obtain the AI (spores and crystals) according to the methodology described by Luna et al. (2002), with some modifications. The fermentation beer obtained was centrifuged and dried at 35°C to obtain the primary powder (PP), comprising the AI and medium solids. Adjuvant ingredients were added, including a sunscreen agent to obtain the TP. The same procedure was repeated to produce 10 batches of the product. Two hundred and fifty milligrams of TP were compressed to make each tablet.

2.3. Laboratory bioassay

The TP of each lot was evaluated regarding the toxic activity *in vivo* bioassays against 4th instar larvae (L4) of *Ae. aegypti*. The bioassays were performed according to the standard protocol for Bti preparations described by de Barjac and Larget-Thiéry (1984). Homogenous groups of twenty L4 were exposed to seven different concentrations of the product in triplicates, for a period of 24 h. Three cups remained untreated for control purposes. The lethal concentrations for 50% (LC₅₀) and 90% (LC₉₀) of the larvae were estimated on the basis of mortality data, using linear log-probit regression, on the SPSS 8.0 for Windows (1997) program. Bioassays were carried out in two steps. The first was a primary screening consisting of one assay performed with all TP lots and the second consisted of three replicate assays with three lots that were chosen from the first experiment, based on their different activity levels. The LC₅₀ median served as parameter for determining the potency of the experimental product, expressed in terms of international toxic units (ITU/mg), compared to IPS82 lyophilized standard from the Pasteur Institute. By way of an Exploratory Analysis of Data Test, an average LC₅₀ was calculated and a 95% interval confidence was determined for the different batches.

2.4. Viable spores quantification

The concentration of viable spores was estimated through bacterial suspension of TP (10 mg/4.5 ml of sterile water) by counting colonies after a thermal shock that kills vegetative cells (kept at a temperature of 80°C for 12 min). After being sequentially diluted, 5 μl samples were placed in five points on petri dishes containing nutrient agar and incubated at 28°C for 18–20 h. The colonies formed were counted and expressed as c.f.u. ml.

2.5. Trials under simulated field conditions (SFC)

These tests were carried out to evaluate the performance of the TP and T formulations from different batches under

simulated field conditions. The experiments were conducted using the methodology described by Melo-Santos et al. (2001). The doses tested were: 250 mg of the TP or one tablet for every 50 L of water from a well. The experiments were performed in transparent plastic containers (56.4 × 38.5 × 37.1 cm) covered with screened lids and that were placed in a greenhouse (96 m²) in shelves permitting direct exposure to sunlight, or in shelves under the shade (Fig. 1). Each experiment was carried out in triplicate and three containers were left untreated as a control. The temperature and the pH of the water were checked three times a week.

2.6. Experimental treatments

The effects of two variables on the residual activity of the product were evaluated: direct exposure to sunlight (Fig. 1) and degrees of water replenishment according to the experimental design shown in Table 1.

2.7. Determination of residual activity

The following parameters were used to evaluate the performance of the product. The first was the initial efficacy, measured using the mortality rate of fifty L4 per container recorded 48 h after application of the product. The second parameter was the persistence or residual larvicidal activity, assessed by counting live pupae resulting from weekly introduction of fifty L1, observed until larvae mortality dropped to 80% or less. Larvae cadavers were not removed from the containers. Persistence was compared using a Mann–Whitney test for two samples, at a 5% significance level, on the SPSS version 8.0 for Windows (1997) statistics program.

2.8. Determination of product shelf life

The stability of the product in terms of shelf life was investigated at three-month intervals for a total period of two years. Tablets from batches 1 and 2 were tested. Eight

individual packages containing 10 tablets each were stored in a dry place, away from light, at temperatures varying from 25 to 27 °C and relative humidity (RH) ranging from 60% to 80%. Three out of the 10 tablets from a package were randomly chosen for evaluation of the initial efficacy against L4 in the SFC test. At the beginning and at the end of the study period the TP activity was also evaluated by bioassays.

3. Results

3.1. Evaluation of toxic activity and concentration of viable spores

The values of LC₅₀ and LC₉₀ from the 10 TP lots are shown in Table 2. The lots show differences in toxicity levels and were grouped according to the value of LC₅₀ at the respective confidence intervals, namely: (1) 0.133–0.166 mg/L; (2) 0.184–0.279 mg/L; (3) 0.390–0.497 mg/L; and (4) >1.2 mg/L. Lot 3 showed the lowest toxicity compared to the others, and was therefore considered an “outlier” (Fig. 2A) and excluded from subsequent evaluations.

The analysis of the confidence intervals (95%) indicated an average LC₅₀ of 0.26 ± 0.10 mg/L for the product, and its potency, based on an LC₅₀ of 0.013 mg/L of the IPS82, was 750 ITU/mg of product. Lots 1 and 7 showed greater larvicidal activity and lots 4 and 5 showed slightly less activity than the average (Fig. 2B). The microbiological viability of TP lots 1, 5, and 10, estimated by the number of colonies per milliliter, were similar, although their LC_{50s} differed up to 3.7 times (Table 3). Tablets made with TP lots 1, 5 or 10, representatives of each confidence interval were tested under SFC in order to detect any performance differences.

3.2. Product performance under simulated field conditions

On SFC, the initial efficacy of both TP and T from lot 1 was 100%. The efficacy of lot 5 and lot 10 tablets was 98%. In control recipients the mortality varied from 0 to 16%.

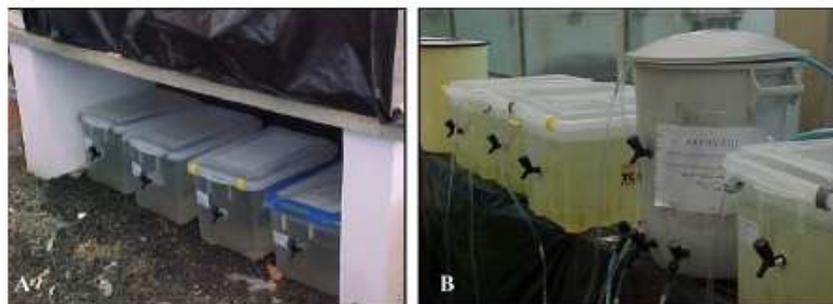


Fig. 1. Rectangular plastic containers used to test experimental products based on *Bacillus thuringiensis israelensis* under simulated field conditions. Containers placed in the shade (A) or exposed to sunlight (B). The large container in (B) shows the system for water replenishment using faucets and hoses for all containers.

342

A.P. de Araújo et al. / Biological Control 41 (2007) 339–347

Table 1
Description of the trials under simulated field conditions (SFC) carried with an experimental product based on *Bacillus thuringiensis israelensis*, against *Aedes aegypti* larvae (Recife-Lab)

Experimental group	Formulation	Experimental conditions	Evaluation period	Water replenishment (%)	Total of larvae ^b
Lot 1	Technical Power	Sun	February–May/2005	20	1650
		Shade	February–August/2005	0 e 20	7200
	Tablet ^a	Sun	February–May/2005	20	1650
		Shade	February–August/2005	0, 20 e 60	10800
Control		Sun	February–May/05	20	1650
		Shade	February–August/05	0, 20 e 60	3600
Lot 10	Technical Power	Sun	September–October/05	20	600
		Shade	November/05–March/06	20	2550
	Tablet	Sun	September–October/05	20	600
		Shade	November/05–March/06	20	2550
Lot 5	Tablet	Sun	September/05–March/06	20	3600
		Shade	September/05–March/06	20	3600
Control		Sun	September–October/05	20	600
		Shade	November/05–March/06	20	2550
		Shade	September/05–March/06	20	3600

^a Tablet containing 1% of active ingredient.

^b 46,800 larvae represents weekly colonization with 50 L1/recipient.

Table 2

Toxic activity of the technical powder from different production lots of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), evaluated under bioassay against 4th instar *Aedes aegypti*-Recife-Lab larvae. On average 480 larvae were used in each bioassay

Technical Powder	P ^a Value	LC ₅₀ ^b (mg/L) (Confidence Interval 95%)	LC ₉₀ ^c (mg/L) (Confidence Interval 95%)
01	0.621	0.144(0.133–0.154)	0.204(0.191–0.222)
07	0.631	0.155(0.146–0.166)	0.237(0.219–0.263)
09	0.330	0.203(0.184–0.222)	0.372(0.340–0.416)
08	0.469	0.233(0.214–0.254)	0.387(0.356–0.427)
10	0.961	0.237(0.213–0.265)	0.436(0.388–0.506)
06	0.530	0.246(0.221–0.273)	0.415(0.377–0.465)
02	0.722	0.254(0.231–0.279)	0.419(0.381–0.469)
05	0.839	0.437(0.390–0.497)	0.786(0.694–0.919)
04	0.647	0.439(0.396–0.485)	0.799(0.728–0.893)
03 ^d		>1.2	

^a P = Probability for 5% significance.

^b C₅₀ = Concentration lethal for 50% larvae.

^c LC₉₀ = Concentration lethal for 90% larvae.

^d Lot not considered in evaluation, for presenting low activity.

The results relating to persistence of larvicidal activity in recipients kept away from sunlight (Table 4) revealed that all TP and T persisted to eliminate all larvae during the 180-day experiment period, after a single treatment, with no meaningful differences between them ($p = 1$). In the last evaluation period, a batch of L4 was added to the containers in order to find out whether the product still remained toxic for larvae in advanced stages, and a mortality rate of 99.1% was observed, demonstrating the toxicity of the product even after 180 days. The larvicidal activity of lot 1 remained unaltered in spite of the periodic replenishment of up to 60% of the water level in containers, showing that

even with water renewal, both TP and T went on to eliminate all larvae within a 180-day period.

When exposed to sunlight, residual larvicidal activity in recipients treated with TP and T from lot 1 continued for 11 weeks (February–May 2005), with larval mortality rate fluctuating between 55% and 100% (Fig. 3). The lowest mortality rate was registered one week after treatment, which represented the period with the largest number of hours of sunshine during the experiment (9.2 h/day). With regard to TP and T from lot 10 tested during September–October 2005, a progressive decrease in the mortality rate was recorded after the second week, with complete loss of larvicidal activity after four weeks (Fig. 4). The highest number of hours of sunlight per day was observed in this period. When the same products were tested during November/2005 to March/2006, larval mortality rates ranged from 66% to 97% for 17 weeks (Fig. 5). In all tests carried out under sunlight, a 100% mortality rate was observed only during the first week of treatment.

The water temperature in the recipients varied from 26.5 °C to 31.3 °C in the sunlight and from 26.3 °C to 29.8 °C in the shade throughout the testing period. The water pH varied from 6.9 to 9.9 in the recipients kept in the sun and from 6.9 to 8.4 in those kept in the shade.

The stability tests of the tablets demonstrated no alteration of the initial efficacy of the product under SFC, throughout two years. The larval mortality rates caused by the product samples kept under normal storage conditions, remained above 97% over 24 months (Table 5). However, a reduction of the TP activity was detected through a bioassay performed after two years of storage. The LC₉₀ value increased from 0.24 to 0.46 mg/L for lot 1 and from 0.42 to 0.79 mg/L for lot 2.

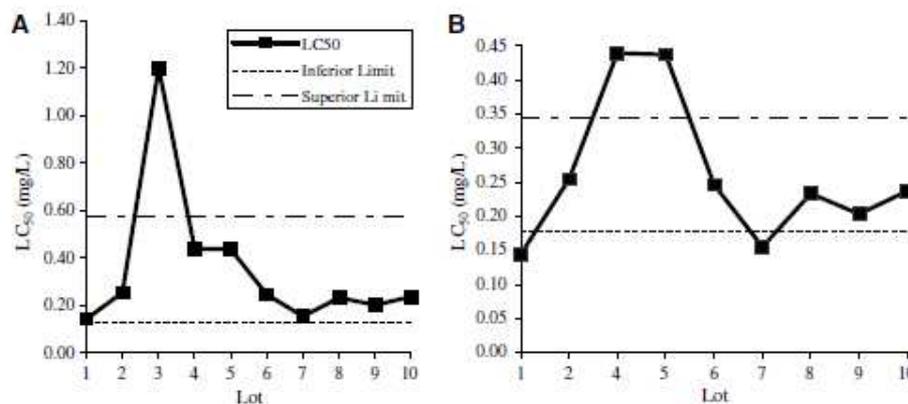


Fig. 2. Values of LC₅₀ of the technical powders of the experimental product based on *Bacillus thuringiensis israelensis*, from different production lots, measured by bioassay against *Aedes aegypti* larvae. (A) Including all the lots. (B) Excluding lot 3, which was considered an outlier.

Table 3

Toxic activity of technical powder (TP) from different production lots of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), evaluated in bioassay against 4th instar *Aedes aegypti*-Recife-Lab larvae and viable spore concentration

Products	LC ₅₀ ^a (mg/L) Average ± SD ^c (Confidence Interval 95%)	LC ₉₀ ^b (mg/L) Average ± SD (Confidence Interval 95%)	Viable spores (c.f.u./ml) ^d
TP-1	0.140 ± 0.004(0.126-0.154)	0.241 ± 0.040(0.220-0.269)	1.5 × 10 ⁷
TP-5	0.514 ± 0.097(0.465-0.573)	0.889 ± 0.161(0.797-1.02)	1.3 × 10 ⁷
TP-10	0.245 ± 0.014(0.207-0.298)	0.436 ± 0.002(0.373-0.575)	2.5 × 10 ⁷
Lyophilizat-IPSS2 ^e	0.013 ± 0.002(0.011-0.015)	0.026 ± 0.004(0.023-0.031)	4.2 × 10 ⁹

^a CL₅₀ = Concentration lethal for 50% larvae.

^b CL₉₀ = Concentration lethal for 90% larvae.

^c Average of three bioassays ± standard deviation.

^d c.f.u./ml = colony formed unit per milliliter.

^e IPSS2 = The international standard for *Bacillus thuringiensis israelensis*.

4. Discussion

The product based on Bti evaluated in this work in technical powder and tablet form showed the desired toxic activity for *Ae. aegypti* larvae, stability under normal storage conditions and excellent persistence under simulated field conditions, mainly in tests performed in the shade.

The LC₅₀ for *Ae. aegypti* larvae of TP samples produced under standardized conditions, showed variations of up to 3.7-fold. Nine out of ten lots showed acceptable toxicity levels. Two of them showed larvicidal activity greater than the estimated average (LC₅₀ = 0.26 ± 0.1 mg/L, potency of 750 ITU/mg) and two had less activity than the average. The literature on the production of entomopathogenic bacterium registers variations in the toxicity, considered as inherent to the production process that results from several factors relating to temperature, dissolved oxygen, pH and sugar concentration during the fermentation process or to the loss of crystals during biomass recovery and formulation (Couch, 2000; Skovmand et al., 2000). According to

Skovmand et al. (2000), there is not always a correlation between the concentration of spores of a given culture and the quantity of crystals produced during the fermentation process. In fact, this was the reason for replacement of concentration of spores as a parameter to measure toxicity (LC₅₀) when the product was standardized (Skovmand et al., 2000). Our results corroborate this observation, since there was no clear correlation between concentration of spores and the toxicity for the different lots of the product (Table 3). In the simulated field test, samples of TP and T from three different lots demonstrated similar performance in the shade, suggesting that the differences observed between the LC₅₀ are not enough to affect larvicidal activity in the field. Some studies suggest that the potency of a product may not be an accurate indicator of its performance in the field, so far as the persistence of the larvicidal activity is concerned (Vilarinhos and Monnerat, 2004). The potency of the product is, however, a very important parameter for the standardization of the production process, which must vary as little as possible (Skovmand et al., 1997; Habib et al., 1998; Skovmand et al., 2000).

344

A.P. de Araújo et al. / Biological Control 41 (2007) 339–347

Table 4
Persistence of the technical powder (TP) and tablet based on *Bacillus thuringiensis israelensis*, against *Aedes aegypti*-Recife-Lab larvae in containers in the shade from February/2005 to March/2006. Tests were carried out in triplicates

Group	Evaluation period	Product	No. larvae	Evaluation period ^a (days)	Mortality ^b larvae (%) over the period $\bar{X} \pm DP^c$
TP-1	February–August/05	TP	3.600	180	100
		Tablet	3.600	180	100
Control ^d	February–August/05	—	3.600	180	4.6 ± 0.64
TP-5	September/05–March/06	Tablet	3.600	180	100
TP-10	September/05–March/06	Tablet	3.600	180	100
Control	September/05–March/06	—	3.600	180	4.4 ± 0.41

^a Period after single treatment with product, during which mortality of larvae exceeded 80%.
^b Mortality of larvae during the period.
^c Average ± standard deviation.
^d Without treatment with Bti.

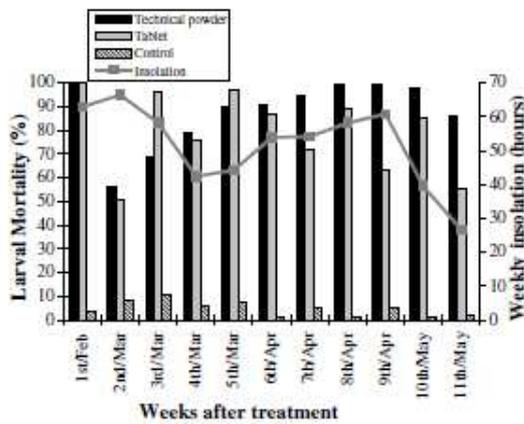


Fig. 3. Residual activity of the technical powder and lot 1 tablet based on *Bacillus thuringiensis israelensis* against 1st instar larvae of *Aedes aegypti*, when exposed to sunlight. Mortality values compared with the level of weekly insolation, from February to May 2005. Source: National Institute of Meteorology (INMET), Station Curado/Recife-PE.

In the course of the production process for an entomopathogenic agent such as Bti, it is expected that an increase in toxic activity will occur as a result of the harvest of the spores and δ -endotoxin at the end of fermentation. In further stages of the process, more specifically to those relating to drying and formulation, the toxicity of the product can be expected to decrease or remain the same (Couch, 2000). In our study, the compression of the technical powder to obtain the tablet does not seem to lead to a loss of larvicidal activity, indicating that this process does not damage or impede the release of the active ingredient. The product in the form of a tablet facilitates the operational work, as it does not require the use of measurement tools, reduces the risk of dosage failure and losses in the application. According to Becker (2003), the development of solid formulation in the form of granules, donuts, tablets, etc, as well as appropriate application methodologies

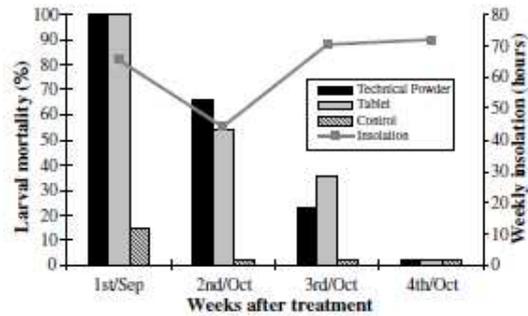


Fig. 4. Residual activity of the technical powder and lot 10 tablet based on *Bacillus thuringiensis israelensis* against 1st instar larvae *Aedes aegypti*, when exposed to sunlight. Mortality rate compared with level of weekly insolation, from September to October 2005. Source: National Institute of Meteorology (INMET), Station Curado/Recife-PE.

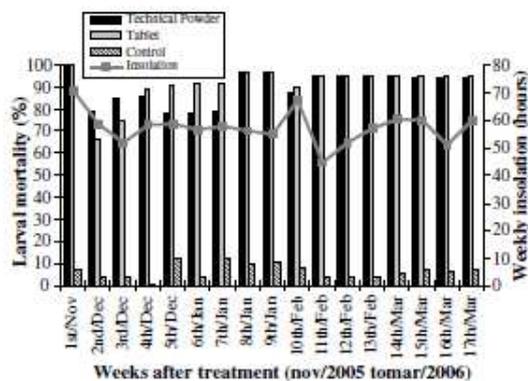


Fig. 5. Residual activity of the technical powder and lot 10 tablet based on *Bacillus thuringiensis israelensis* against 1st instar larvae of *Aedes aegypti*, when exposed to sunlight. Mortality rate compared with the level of weekly insolation. Source: National Institute of Meteorology (INMET), Station Curado/Recife-PE.

gives rise to advantages in operational control programs, such as ease of storage, transportation and applicability in the field, or greater stability and sustained release of the active ingredient. Formulations of the tablet type may be more adequate for the particular characteristics of breeding sites of mosquito species such as *Ae. aegypti*, as they are more practical to apply and more accepted by the population, especially since they do not change the appearance of the water and do not generate solid residues in the recipient (Becker, 2000; Melo-Santos et al., 2001).

At the concentration used in the SFC tests, the tablet remained efficient after two years of storage, suggesting that the characteristics relating to the larvicidal activity of the pathogen, and the preservation and rate of release of the active ingredient remained stable enough to promote high larval mortality, a fact evidenced by the reproducibility of the results throughout 24 months of testing. However, these results indicated that the evaluation of initial activity under SFC using field dose (approximately 11 folds the LC₉₀ value) is not sensible enough to detect loss of the TP toxicity.

According to information from FUNASA (2002), the most common breeding sites for *Ae. aegypti* in Brazil are domestic containers for water storage. Common characteristics of most of these are to be partially or totally covered with lids, although they are not always mosquito-proof, and the water is constantly used and replaced. In the experimental design of the SFC we chose to simulate the replenishment of water in domestic containers and exposure to the sun. The colonization of containers treated with L1 is also a way to simulate conditions in the field, since the female mosquitoes lay their eggs in the treated breeding site. The use of L1 instead of older larvae increases the sensitivity of the test, as demonstrated by Melo-Santos et al. (2001).

In the case of Bti, whether exposed to sunlight or not, both the TP and the T had identical initial control efficacy (mortality rates from 98% to 100%), indicating that the product formulated releases a satisfactory amount of crystals in the trophic zone of the larvae within the first 48 h after application. This factor is extremely important to ensure efficient larvicidal activity after a few hours, since under natural conditions larvae from different stages may be present in the container at the time of application of the product. In the shade, the products tested remained

100% efficacious for 6 months. The replenishment of up to 60% of the treated water and the consequent dilution of the product could have a negative effect on the persistence of larvicidal action, although this did not occur during the period of observation (180 days). The tablet settles quickly and remains at the bottom of the container, suggesting that most of the active ingredient remains concentrated in that region. Thus, it is possible that the process of water refilling does not agitate the water sufficiently to cause crystals and spores to resurface, which would favor its elimination. Benjamin et al. (2005), testing VectoBac DT[®] tablet in earthen containers for drinking water with weekly 50% water replenishment, observed that the formulation sank to the bottom on introduction and the Bti toxin was concentrated along the sides and at the base of the treated containers, with the result that the treated domestic water used by people contained little or no Bti toxin. The authors reported a 166-day persistence of this product against *Aedes* spp. Long persistence of a tablet based on Bti, was also observed by Mulla et al. (2004), who registered excellent control of *Ae. aegypti* larvae in ceramic jars for a period of about 112 days. It is known that the persistence of the products depends as much on the characteristics of its own formulation as well as the environmental conditions of the breeding site. The continuous viability of the spores is another important factor, because under favorable conditions recycling may occur through the production of toxins in the midgut of larvae killed by Bti (Aly, 1985; Aly et al., 1985; Khawaled et al., 1988).

The results of this study confirm the importance of solar radiation as a negative factor in the persistence of Bti in the environment, as observed in previous studies (Obeta, 1996; Nayar et al., 1999; Thiéry et al., 1999; Melo-Santos et al., 2001; Vilarinhos and Monnerat, 2004). In the test performed during the period of higher incidence of solar radiation (October 2005), there was a rapid decrease in the mortality rate, reaching less than 70% in the second week and total loss of larvicidal activity in the 4th week after treatment. Similar results have been observed in previous studies using containers placed outdoors (Melo-Santos et al., 2001; Vilarinhos and Monnerat, 2004). In the containers exposed to sunlight, changes in some aspects regarding water quality were observed after the first week, such as micro algae growth and increased alkalinity. The presence of microorganisms and detritus in suspension in

Table 5

Mortality of 4th instar *Aedes aegypti* larvae, according to the storage time of tablet based on *Bacillus thuringiensis israelensis*, from two different production lots, kept at ambient with temperature varying from 25 to 27 °C and relative humidity from 60% to 80%. The tests were carried out every three months for two years

Tablet	Mortality of larvae (%) ^a every 3 months								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
01	98.7 ± 1.1	100.0	98.7 ± 1.1	100.0	98.7 ± 1.1	98.7 ± 1.1	99.1 ± 0.5	100.0	100.0
02	99.1 ± 0.5	98.7 ± 1.1	100.0	100.0	100.0	99.1 ± 1.1	100.0	100.0	100.0
00 (control)	0	1.0 ± 1.4	0	0.5 ± 0.7	1.0 ± 1.4	1.0 ± 1.4	0	0	0

^a Average ± Standard deviation.

the aquatic environment may affect the availability of bio-insecticides due to the adsorption of BtI or Bs spores and crystals to particulates before they settle to the bottom of the breeding site (Ohana et al. 1987; Skovmand and Bau-duin 1997; Sheeran and Fisher, 1992). Moreover, a very alkaline pH favors the solubility of the crystals, making pro-toxins more prone to degradation. The association of such factors would contribute to reducing the larvicidal activity of the product, especially when solar radiation reaches levels ≥ 9 h of continuous sunlight per day. On the other hand, the prolonged larval control observed under specific environmental situations, suggests that BtI recycling might compensate partial loss of toxic crystals caused by UV and others deleterious factors. In tests under exposure to sunlight performed at other times of the year, the persistence was surprisingly long: 77–119 days. Despite the decrease in levels of mortality below the limit previously established (80%), the evaluation was maintained on such tests in order to confirm the loss of activity of the product. It became evident that suspension of evaluation at that time would lead to an erroneous interpretation of the persistence time, since larvicidal activity was restored in the second week after treatment, keeping the mortality rate over 80% (Figs. 3 and 5).

Bacterial recycling may also play an important role in the length of persistence. In recent semi-field tests, we observed a higher concentration of BtI spores in plastic containers six months after a single treatment, providing a similar long-term control of *Ae. aegypti* larvae (Araújo et al., unpublished data), suggesting the occurrence of BtI recycling in this particular environment. It is important to highlight that, besides living in clean water, *Aedes* larvae, differently from *Culex quinquefasciatus* larvae, feed preferentially on the bottom and wall surfaces, which greatly favors a prolonged control resulting from BtI recycling.

The results confirm the efficacy of this product for *Ae. aegypti* larvae control. The tablet was shown to be the most appropriate formulation for use in domestic containers, to be easily applied, and to last for long periods without a reduction in excellent levels of activity.

Acknowledgments

We are grateful to CAPES and Fundação Oswaldo Cruz/PDTSP/Rede Dengue for the financial support, to the Institute Pasteur, for providing the BtI reference powder IPS82 and to Dr. André Freire Furtado and Dr. Tereza Magalhães for the valuable scientific contribution in the correction of this manuscript.

References

- Alves, S.B., Moino Jr., A., Almeida, J.E.M., 1998. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle microbiano de insetos. FEALQ, São Paulo, pp. 1143–1157.
- Aly, C., 1985. Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* 45, 1–8.
- Aly, C., Mulla, M.S., Fedenci, B.A., 1985. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera:Culicidae). *J. Invert. Pathol.* 46, 251–258.
- Batista Filho, A., Alves, S.B., Alves, L.F.A., Pereira, R.M., Augusto, N.T., 1998. Formulação de entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle microbiano de insetos. FEALQ, São Paulo, pp. 917–956.
- Becker, N., 2000. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-LeRoux, C. (Eds.), Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 383–396.
- Becker, N., 2003. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae: a new application technique. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19, 63–66.
- Becker, N., Ludwig, M., 1993. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9, 221–224.
- Becker, N., Rettich, F., 1994. Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10, 527–533.
- Beesel, J.J., García, J., Johnson, M., 1996. Effects of three larvicides on the production of *Aedes albopictus* based on removal of pupal exuviae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12, 499–502.
- Benjamin, S., Rath, A., Fook, C.Y., Lim, L.H., 2005. Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation, vectobac DT, for control of dengue mosquito vectors in potable water containers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36, 879–892.
- Couch, T.L., 2000. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-LeRoux, C. (Eds.), Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 297–314.
- De Barjac, H., Target-Thierry, 1984. Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. *Mimeogr. Doc.*, WHO/VBC/84.892, pp. 1–10.
- Fundação Nacional de Saúde, 2002. Vigilância epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue-2002.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* 37, 616–636.
- Guillet, P., Kustak, D.C., Philippo, B., Meyer, R., 1990. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for Onchocerciasis Control in West Africa. In: De Barjac, H., Sutherland, D.J. (Eds.), Bacterial control of mosquitoes and blackflies. Rutgers University Press, New Jersey, pp. 187–199.
- Habib, M.E.M., Alves, S.B., Alves, L.F.A., 1998. Padronização de inseticidas microbianos. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle microbiano de insetos. FEALQ, São Paulo, pp. 779–797.
- Hougaard, J.M., Yaméogo, L., SéKétéli, A., Boatin, B., Dadzie, K.Y., 1997. Twenty-two years of blackfly control in the onchocerciasis control programme in west Africa. *Parasitology Today* 13, 425–431.
- Khawaked, K., Barak, Z., Zaritsky, A., 1988. Feeding behavior of *Aedes aegypti* larvae and toxicity of dispersed and of naturally encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invert. Pathol.* 52, 419–426.
- Lima, J.B.P., Cunha, M.P., Silva Júnior, R.C., Galardo, A.K.R., Soares, S.S., Braga, I.A., Ramos, R.P., Valle, D., 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 329–333.
- Luna, C.L., Lopes, C.E., Massarani, G., 2002. Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 spores from growth medium by flocculation/sedimentation. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 25, 213–216.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T., Takaku, L., Glässer, C.M., Garbeloto, V.C., Cirino, V.C., 1999. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública* 33, 521–522.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T., Takaku, L., Glässer, C.M., Garbeloto, V.C., Bracco, J.E., 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 703–708.

- Mardini, L.B.L.F., Torres, M.A.N., Silveira, G.L., Atz, A.M.V., 2000. Simulium spp. Control Program in Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95, 211–214.
- Melo-Santos, M.A.V., Sanches, E.G., Jesus, F.J., Régis, L.N., 2001. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis for larvicidal control of *Aedes aegypti*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96, 859–860.
- Mulla, M.S., 1990. Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes. In: De Barjac, H., Sutherland, D.J. (Eds.), Bacterial control of mosquitoes and blackflies. Rutgers University Press, New Jersey, pp. 134–160.
- Mulla, M.S., Thavara, U., Tawatsin, A., Chompoosri, J., 2004. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. J. Am. Mosq. Control Assoc. 20, 64–73.
- Nayar, J.K., Knight, J.W., Aly, A., Carlson, D.B., O'Bryan, P.D., 1999. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15, 32–42.
- Obeta, J.A.N., 1996. Effect of inactivation by sunlight on the larvicidal activities of mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* H-14 isolates from Nigerian soils. J. Commun. Dis. 28, 94–100.
- Ohana, B., Margalit, J., Barak, Z., 1987. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under simulated field conditions. Appl. Environ. Microbiol. 53, 838.
- Régis, L., Silva, S.B., Melo-Santos, M.A.V., 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95, 207–209.
- Régis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends in Parasit. 17, 377–380.
- Ruas Neto, A., 1984. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simuliídeos no Rio Grande do Sul. 1. Susceptibilidade a campo. Boletim de Saúde 11, 21–26.
- Sheeran, W., Fisher, S.W., 1992. The effects of agitation, sediment, and competition on the persistence and efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bt). Ecotoxi. Environ. Safety. 24, 338–346.
- Skovmand, O., Bauduin, S., 1997. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African countries. J. Vec. Ecol. 22, 43–51.
- Skovmand, O., Hoegh, D., Pedersen, H.S., Rasmussen, T., 1997. Parameters influencing potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products. Biol. Microb. Contr. 90, 361–369.
- Skovmand, O., Isabelle, T., Benzoni, G., 2000. Is *Bacillus thuringiensis* standardization still possible? In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-Leroux, C. (Eds.), Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 275–295.
- Thiéry, I., Fouque, F., Gaven, B., Lagneau, C., 1999. Residual activity of *Bacillus thuringiensis* serovars *medellin* and *jeyathesan* on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15, 371–379.
- Vilarinhos, P.T.R., Monnerat, R., 2004. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 20, 311–314.

Apendice C – 2º Artigo publicado

50 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103(1): 50-59, February 2008

Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system

Lêda Regis^{1*}, Antonio Miguel Monteiro¹, Maria Alice Varjal de Melo-Santos,
José Constantino Silveira Jr², André Freire Furtado, Ridelane Veiga Acioli³, Gleice Maria Santos,
Mitsue Nakazawa, Marília Sá Carvalho⁴, Paulo Justiniano Ribeiro Jr⁵, Wayner Vieira de Souza²

Departamento de Entomologia ¹Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, PE, Brasil ²Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais-INPE, São José dos Campos, SP, Brasil ³Secretaria Municipal de Saúde, Recife, PE, Brasil ⁴Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁵Departamento de Estatística, Universidade Federal do Paraná-UFPAR, Curitiba, PR, Brasil

A new approach to dengue vector surveillance based on permanent egg-collection using a modified ovitrap and Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) was evaluated in different urban landscapes in Recife, Northeast Brazil. From April 2004 to April 2005, 13 egg-collection cycles of four weeks were carried out. Geo-referenced ovitraps containing grass infusion, Bti and three paddles were placed at fixed sampling stations distributed over five selected sites. Continuous egg-collections yielded more than four million eggs laid into 464 sentinel-ovitraps over one year. The overall positive ovitrap index was 98.5% (over 5,616 trap observations). The egg density index ranged from 100 to 2,500 eggs per trap-cycle, indicating a wide spread and high density of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) breeding populations in all sites. Fluctuations in population density over time were observed, particularly a marked increase from January on, or later, according to site. Massive egg-collection carried out at one of the sites prevented such a population outbreak. At intra-site level, egg counts made it possible to identify spots where the vector population is consistently concentrated over the time, pinpointing areas that should be considered high priority for control activities. The results indicate that these could be promising strategies for detecting and preventing Ae. aegypti population outbreaks.

Key words: dengue vector - population densities - ovitraps - Bti - vector control - Recife

Dengue fever is currently the most globally widespread insect-borne virus infection, causing 50 – 100 million cases per year in more than 100 endemic countries. Dengue virus (DENV) is transmitted to humans mainly by *Aedes aegypti* Linnaeus and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) mosquitoes, which are also vectors of yellow fever, West Nile and other viruses.

The high efficiency of the virus transmission mechanism combined with a number of biological features of *Ae. aegypti*, its main vector, contribute to explosive epidemics of dengue, which are mainly contained by the immunity status of the human population. Like other vector mosquitoes, the *Ae. aegypti* population is subject to continual fluctuations in density, increasing rapidly in size due to high fecundity and fertility and short generation time. However, some behavioural features make this species a more efficient pathogen vector and more difficult to control than other species of mosquito. For instance, the female *Aedes*' multiple blood meals increase

the opportunities for virus inoculation (Scott et al. 2000). Larval behavior make it very difficult to monitor them at breeding sites by taking water samples. *Culex quinquefasciatus* (Say) lay grouped eggs and use a pheromone to aggregate oviposition by co-specific females in well-defined large sites, favouring intervention for larval control. However, *Aedes* lay eggs in an enormous variety of containers, posing a real challenge for control of this species using larvicides alone, as is feasible in the case of *Culex* (Regis et al. 2000). Furthermore, the resistance of eggs to dry conditions greatly facilitate vector dispersion and capacity to remain in the environment.

As a vaccine is not yet available, preventing sudden increases in vector population is the only way of avoiding dengue transmission outbreaks. In a context where no important changes in human population immunity occur, an increase in the vector population and consequently in vector-to-human contact, will increase dengue virus transmission. It is known that changes in density are important in disease epidemiology because the vector-to-host ratio is a determinant of the vector capacity of a population (Black & Moore 1996). The implementation of preventive measures targeting critical locations at specific times requires efficient vector surveillance tools and methods sensitive enough to predict or detect in real time a sudden mosquito population growth. Dengue vector surveillance is classically based on the Premise Index (PI) and the Breteau Index, both of which use visual detection of larvae in domestic containers. *Ae. aegypti* lar-

Financial support: MS-Decit/CNPq (50154020332); CNPq (301277/2005); Fiocruz-PDTSP/Rede Dengue (RDVE-03)
* Corresponding author: leda@cpqam.fiocruz.br
Received 3 August 2007
Accepted 11 February 2008

vae visualization is for many reasons an inaccurate technique, especially because of the larvae's ability to escape rapidly and their capacity to remain submerged for long periods (Clements 1992). The percentage of premises or containers where *Aedes* larvae are found, registering as positive a container whether just one or thousands larvae are present does not provide information regarding mosquito population density, and these indices do not therefore seem to be an adequate way of meeting vector surveillance needs.

Given the biological specificities of *Aedes* populations, trapping eggs or adult mosquitoes would be a more appropriate way of locating sites and times where action should be concentrated to prevent or lessen the intensity of disease outbreaks. Using mosquito egg traps for vector surveillance seems to be a current trend in dengue endemic countries, since this method allows better assessment of infestation densities than the conventionally used methods based on the search for larvae (Ai-leen & Song 2000, Braga et al. 2000, Polson et al. 2002, Morato et al. 2005).

The fact that high-cost and long-term programs to control dengue vector population very often do not meet with success suggests that preventing and controlling the disease will require new vector surveillance and control technologies based on field studies of population biology and spatial-temporal distribution of the vector in its natural environment.

We present here a first report on the efforts of a network of research and public health institutions which have come together to offer a new insight and to develop new tools for mosquito population surveillance and control through the integration of environmental aspects, detection of risk factors and warning methods based on a longitudinal field-study using a Geographical Database and Spatial Information Technology. The main purpose is to produce tools to provide more efficient outbreak detection and to prevent vector population outbreaks in space and time.

MATERIALS AND METHODS

Study sites - Recife City (8° 03' S, 34° 52' W, mean elevation: 5 m) is the main lymphatic filariasis (LF) endemic area and the second for dengue cases in Brazil. With 1.4 million inhabitants living in a 209 Km² area, with many rivers and canals, poor sanitation conditions, high temperatures (ranging from 22°C to 32°C) and relative air humidity (70% - 90%) throughout the year, the city has excellent conditions for breeding mosquitoes all year round, which explains the maintenance of LF and dengue transmission by *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* respectively. A hot season with sparse rainfall from January-April is followed by a heavy rainy season (May-August) and a dry season (September-December). In recent years, the local health service has established a structured mosquito surveillance and control program. The Environmental Health Program currently employs 726 agents (ASA) visiting premises every two months. Among other health actions, they are responsible for the control of LF and dengue vectors, using *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bt) as larvicides in the whole urban area, as well as for environmental management, information, education and mobilization.

Five sites encompassing seven of the 94 districts of Recife were selected for this study (Fig. 1), based on the disease transmission risk (DTR- high, medium and low risk scores) and life quality (LQ-scores I to III) stratifications, both of which are drawn up by the Recife City Municipality, and the selection of districts representing the different landscapes found in the city.

Site 1 - Districts: Casa Forte and Pamamirim - with a surface area of 1.17 km² and a population density of 21,386 inhabitants/km² living predominantly in high-rise buildings with up to 20-40 floors. This site is classified as having low DTR and high LQ (score I).

Site 2 - District: Brasília Teimosa, located on the sea front with a 0.62 km² surface area, population density of 30,895 inhabitants/km² living in very small dwellings. The site is classified as having high DTR and low LQ (score III).

Site 3 - District: Engenho do Meio - with 0.89 km² area, a density of 11,865 inhabitants/km² living predominantly in low-rise individual houses, more often with structured urbanization, though incorporating small slums. This site is heterogeneous having low to medium DTR and LQ scores I and III.

Site 4 - Districts: Morro da Conceição and Alto José do Pinho - Taken as a whole the area represents 0.79 km². Each district is located on a small hill (50 and 62 m high), the highest ground in Recife. The inhabitants (10,560/km²) live, for the most part, in unplanned housing. This site is classified as medium DTR and has LQ scores of II and III.

Site 5 - Dois Irmãos and Sitio dos Pintos Districts, suburban areas located near to a remnant of the Atlantic Forest. Households are usually spaced out and flanked by green areas. This site has 1.16 km² area and the lowest demographic density: 3,737 people/km², with high DTR and low LQ (score III).

The Design of the Experiment and its Spatial Epidemiological Database - The experiment started in February 2004, with full involvement of the local health service through ASA. It is based on an urban socio-environmental stratification of Recife into five sites. At each site, 80 to 100 ovitraps have been installed, geo-referenced and registered in the Recife-SAUDAVEL Geographic Epidemiological Database (GED). The ASA have also collected information on environmental conditions such as the presence of outdoor yards, the water supply system, and water storage habits in the premises hosting the traps. Continuous egg collection was carried out using 464 sentinel-ovitraps (S-OVT) placing 80-100 traps per site. Each S-OVT was installed at a fixed sampling station, where it remained for 24 months (data from the first year of egg-counting are reported in this article, while those from the second year are being analyzed for publication). The eggs were counted on a rota basis, i.e., 1/4 of the traps each week. These data are inserted into the database using a web-based interface that has been developed by the SAUDAVEL network (Monteiro et al. 2005) at the National Institute for Spatial Research-INPE and at CPqAM/Fiocruz. This has been designed to be a web-based entry to the SAUDAVEL database. It should avoid

52 Detection of Aedes population outbreaks * Léda Regis et al.

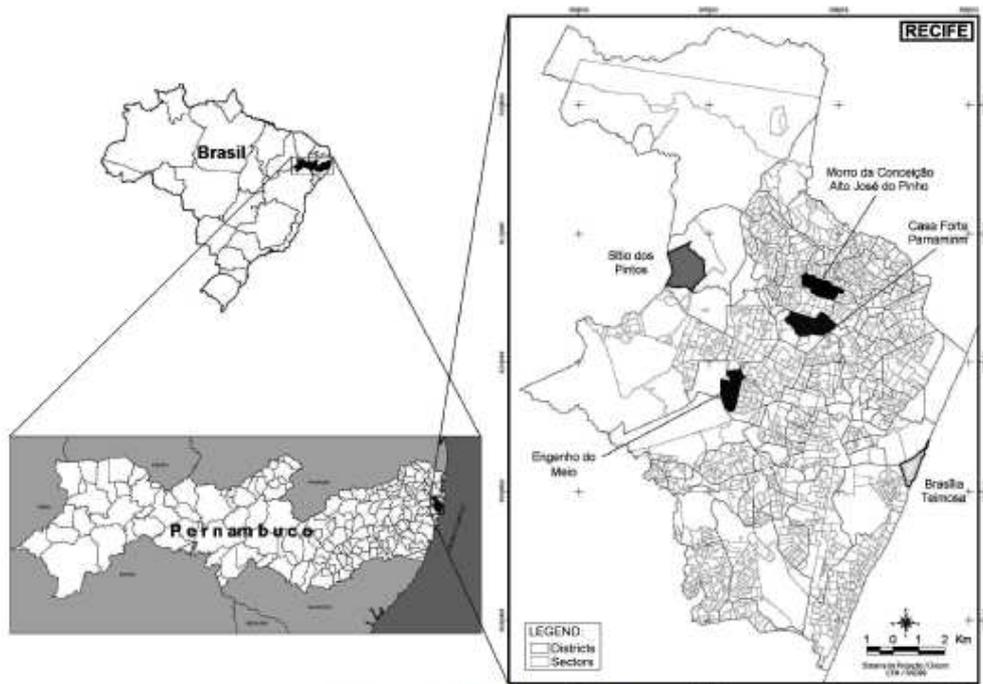


Fig. 1: the location of the study sites in Recife, Brazil.

complex analysis and provides an easy way of browsing the geographical database and having quick summaries for some spatio-temporal queries in the stored data. Remote sensing satellite imagery, pictures of the traps, meteorological data and census tract data are integrated through the SAUAVEL-GED. Climatic data, temperature, relative humidity, and rainfall are daily recorded at a point-station in Recife monitored by the National Institute of Meteorology. An intensive control strategy has been introduced to integrate and reinforce the basic measure (larvicide with a Bti product) applied as part of the government program for controlling the *Aedes* population. It is based on mass collection of *Aedes* eggs using a large number of ovitraps. This control intervention was implemented from December 2004 to May 2005 at the Sites 1 and 3.

Geo-referenced S-OVT - A modified model of the conventional ovitrap (Fay & Eliason 1966) was used for sampling *Aedes* eggs. It consists of a black plastic cup initially filled with 1 l of grass infusion diluted in water to 30%. However, due to water evaporation a number of traps were found empty after four weeks at the sampling-station, thus the cups were replaced by larger containers with 2 l of infusion. Three 5 x 15 cm wooden paddles are vertically fixed with clips to the inner wall of the cup as oviposition substrates. A commercial Bti-based product (2 g/trap) was added as a larvicide, allowing it to remain in the field without risk of becoming a larval habitat. This trap design was based on a previous field evaluation of

ovitraps containing grass infusion and Bti (Santos et al. 2003), which results have shown that: 1- Bti does not reduce the attractiveness of the trap for oviposition by gravid females; 2- the presence of this larvicide removes the risk of transforming the ovitrap into a mosquito development site; and 3- more eggs were laid in the Bti treated trap compared to the control. We have recently shown that the larvicidal activity of Bti can persist for six months in containers protected from direct sunlight (Araujo et al. 2007), corroborating similar results on Bti long residual effects reported by others authors (Mulla et al. 2004, Benjamin et al. 2005, Setha et al. 2007). Besides being an efficient and safe larvicide (Regis et al. 2001), Bti seems to work as an oviposition stimulant for *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Santos et al. 2003, Stoops 2005).

Paddles, Bti and infusion were replaced monthly. The trap was hung in the exterior area of a residential premise 1m above ground level in the shade and protected from rainfall. Each trap site was geo-referenced, photographed, and its surroundings described, focusing on water supply frequency, water storage containers and other aspects favoring mosquito breeding. The data have been registered in the SAUAVEL-GED. After being air-dried at room temperature, labelled paddles were examined under stereoscopic microscope and the number of eggs was recorded with the aid of a manual cell counter.

Control ovitraps (C-OVT) - For the purposes of mass collection of eggs, a higher Bti dosage (4g/trap) was used

in 2 l of 10% infusion per C-OVT. The aim was to set two traps per premises and up to six per "strategic place". A total of 5,602 C-OVT have been installed, 3,685 of them placed within site 3 (4,140 traps/km²), and 1,917 at site 1 (1,638 traps/km²). The paddles were taken to the Health Service every two months, incinerated in an appropriate manner and replaced with new ones. The Bti and infusion were also replaced. The overall number of eggs collected in these traps was estimated on the basis of the average number of eggs per S-OVT simultaneously collected from the corresponding site.

Sentinel sampling-stations distribution - Spatial units were defined using a grid of cells measuring 40 x 40 m at each site. 20% of the units, as well as one premise within each cell were randomly chosen to set the ovitrap (Fig. 2). The number of ovitrap installed at the different sites was as follows: site 1: 100; site 2: 80; site 3: 100; site 4: 100; site 5: 84. Due to operational difficulties the number of ovitrap at sites 1 and 5 was lower than initially planned. Sentinel-ovitrap distribution varied from 63 to 129 traps/km² at different sites. Through this sampling plan, an overall percentage of 2.9% of the houses within the sites have been sampled.

Aedes species identification - Fourth instar larvae (L4) reared in the laboratory from field-collected eggs were used for species identification. Eggs collected in 20-25 S-OVT per site during one week in April 2004 were

used. For sample size calculation *Ae. albopictus* prevalence of at least 0.1% was assumed, based on a recent survey carried out in different districts of the city (data not shown). Assuming a hypergeometric distribution with $p = 1/1000$, the sample size required per district was set as 1,000 identified individuals.

Statistical analysis - Using the digital geographical database, spatial distribution of the intra-site critical areas for egg counts were analysed, using open source software (TerraView - www.dpi.inpe.br/terraview), by calculating the Kernel density estimator (Bailey & Gatrell 1995). The spatial statistical analysis capacity built into the TerraView package has been much improved by the SAUDAVEL experiment *Aedes* spp. density monitoring alert system and its multi-institutional network of support. To analyse the predictive power of a specific egg count we calculated the Pearson's correlation coefficients with respective scatters plots correlating mean number of eggs in a given count compared with the number of eggs counted in the previous week.

Ethical approval - The study project was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Brazil.

RESULTS

The performance of the ovitrap - Over the study period, relatively few (< 1% of 464) S-OVTs needed to be replaced due to cup damage or disappearance. The use of three paddles per trap provided 225 cm² of oviposition substrate. Results showed that such an area is enough to support a high egg deposition capacity. As for example, at 48 out of 5,616 events, a single trap caught > 4,000 eggs over a 4-week cycle. The overall mean number of eggs per trap was 722.4±788.3 with a maximum of 7,784 eggs laid in a single trap. The distribution of eggs per trap (Fig. 3) suggests that the maximum capacity could not be reached, so the number of eggs collected seems not to be limited by the trap's capacity.

Aedes species - A total of 8,897 L4 were identified to species. *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were found at all the sites and no other *Aedes* species was recorded in this study. *Ae. aegypti* was the predominant species in 4 out of 5 sites, accounting for 99.9% (site 2, located 11.6 km from the forest), 99.4% (site 3), 94.0% (site 4) and 87.1% (site 1). *Ae. albopictus* was the predominant

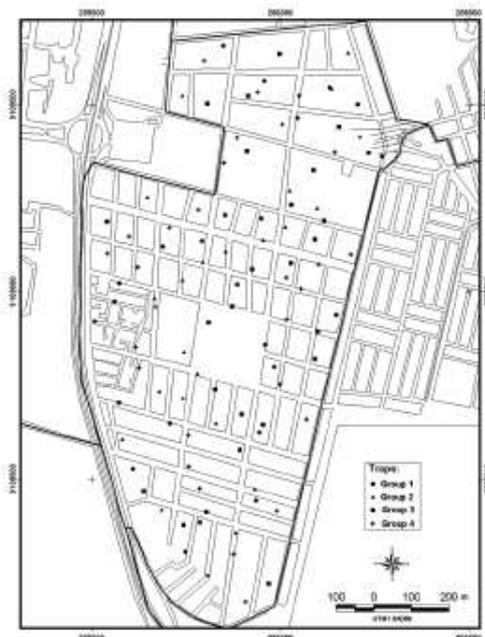


Fig. 2: the geographical distribution of 100 sentinel ovitrap placed within the site 3 in Recife, Brazil. The eggs collected during a 28-day cycle in each group of 25 traps were counted weekly.

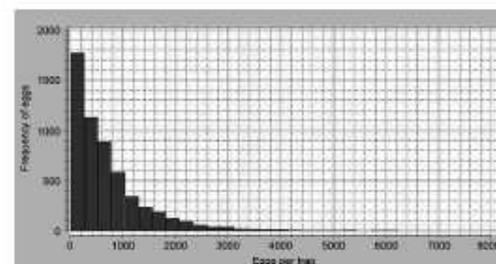


Fig. 3: frequency of the number of eggs collected per sentinel ovitrap.

species (88.4%) at site 5, adjacent to the forest. The presence of *Ae. albopictus*, however, was not detected by the larvae search method used by the local health service, either at sites 2 and 3 during 2004 or at site 5 from March to December that year (Table).

Abundance and distribution of eggs - During the period studied, 13 egg-collection cycles were completed, the first between 27 April and 18 May 2004 and the last between 29 March and 19 April 2005, yielding a total of 4,055,372 eggs. Oviposition activity was recorded the year round. Very high percentages of positive S-OVT (containing at least one *Aedes* egg) were found: 5,530 positive traps out of 5,616 observations over one year, meaning an overall positive ovitrap index of 98.5%, with little variation among sites: from 97.6% (site 4) to 99.0% (site 2).

The mean number of eggs caught per S-OVT in a 28-day cycle egg density index (EDI) over one year indicated high densities of *Aedes* spp. breeding populations everywhere (Fig. 4) with marked fluctuations in time, means ranging from 100 to 2,500 eggs per trap-cycle. The higher EDI values, ranging from 400 to 2,500 (mean 954.1 ± 944.4) eggs/trap-cycle, were recorded at site 2, followed by site 1 (Fig. 4), where EDI ranged from 300 to 1,700 (mean 849.1 ± 937.5) eggs/trap-cycle and the lowest EDI (100 - 750) were found at site 5. The EDIs were generally higher from January to August, a period that includes the heavy rainy season (May-August), than from September to December. Infestation intensity as well as its temporal distribution pattern was similar for sites 1 (high LQ), 2 (low LQ) and 4 (low-medium LQ): lower oviposition during the dry season followed by an important population growth starting in January and peaking in March (sites 1 and 2) or later in July (site 4). This sharp increase in oviposition activity, concomitant with temperature elevation and sparse rainfall, was specially accentuated in site 2 where the EDI increased 4.4 folds (from 425 to 1,893 eggs/trap-cycle) within two months (Fig. 4). Such population outbreak was not observed at site 3 (Fig. 4). A different egg distribution pattern over time, with the lowest densities occurring from January to March, was observed in the less densely inhabited area (site 5), where *Ae. albopictus* was the predominant species.

Fig. 5 shows the scatter plots demonstrating high correlation levels between the mean number of eggs per ovitrap ($p < 0.01$ for all sites) counted in a given week and the value recorded in the previous week. Each different trap group constitutes independent random samples and provides sample data from the whole population density in each district in different weeks. Therefore, the results suggest an important temporal dependence in the distribution of the eggs and constitute an important starting point for the development of an alert system.

Concerning the intra-site distribution of eggs, Fig. 6 shows the spatial analysis of eggs collected at site 2, on three different occasions: in December/2004, when the lowest number of eggs occurred and at the two peaks of breeding population, June/July 2004 and March 2005. Infestation hotspots were detected at some sampling stations for the full duration of the study, regardless of the periods of lowest and highest oviposition activity. The map representing the accumulated density of eggs at the site over the year also confirms this fact. Similar phenomenon was observed in the other studied sites (data not shown).

Mass egg collection as a control strategy - For site 3 it was estimated, based on the mean number of eggs collected in the S-OVT, that approximately 6.3 million eggs were collected and incinerated from December 2004 to April 2005. Differently from the observations at other sites, *Aedes* population density remained below the mean level at site 3 throughout this period (Figs 4, 7). At site 1, however, where a lower C-OVT concentration was used, an important increase in oviposition activity during the intervention was not prevented (Fig. 4).

DISCUSSION

A new approach to dengue vector surveillance based on permanent egg-collection using a modified ovitrap and Bti was evaluated in different intra-urban landscapes. Results from the first year of collection indicate that this could be a promising strategy for detecting *Ae. aegypti* population outbreaks. In addition to being a sensitive tool as an indicator of reproductively active *Aedes* populations, the ovitrap provides an indirect estimate of the feeding activity of the mosquito population (Hoeck

TABLE
The Premise Index for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the studied sites during 2004, according to the Health Department of Recife Municipality, Brazil

Site	District	Premise Index in 2004											
		Cycle 1		Cycle 2		Cycle 3		Cycle 4		Cycle 5		Cycle 6	
		<i>aegy</i> ^a	<i>albop</i> ^b	<i>aegy</i>	<i>albop</i>								
1	Casa Forte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Parnamirim	2.9	0	2.8	0.4	2.4	0.9	2.8	0.5	3.3	0	3.3	0
2	Brasília Teimosa	2.0	0	0.6	0	0.8	0	1.2	0	1.1	0	1.1	0
3	Engenho do Meio	8.0	0	2.5	0	3.9	0	2.2	0	1.9	0	1.9	0
4	Morro da Conceição	2.3	0	0.7	0.1	0.4	0	0.2	0	0	0	0	0
	Alto José do Pinho	0.4	0	0.5	0	0.2	0	0.5	0	0	0	0	0
5	Dois Irmãos	0.2	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sítio dos Pintos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a: *Aedes aegypti*; b: *Aedes albopictus*.

56 Detection of *Aedes* population outbreaks • Leda Regis et al.

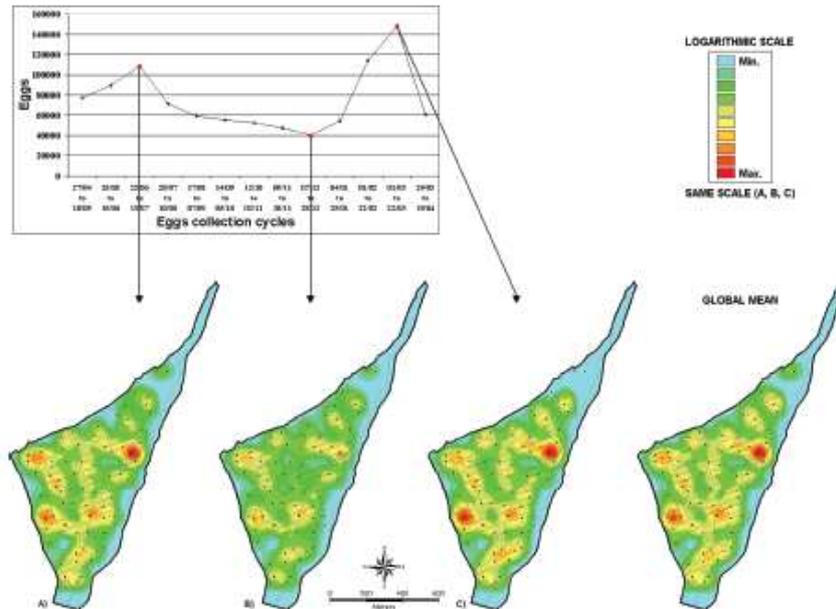


Fig. 6: Kernel density maps pointing critical areas for *Aedes* spp. eggs density within the site 2, on three selected occasions: June-July 2004 (A), December 2004 (B), and March 2005 (C). Map at the right side shows the global mean of eggs for the whole period (April 2004 to April 2005).

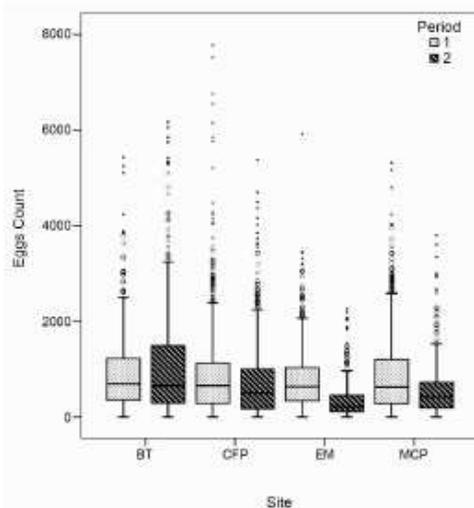


Fig. 7: comparison of eggs collected during the period 1 (April-November 2004) and the period 2 (December 2004 – April 2005) at sites 1 (CFP), 2 (BT), 3 (EM) and 4 (MCP). Eggs mass collections were carried out using 1,638 traps/km² in the site 1 (CFP) and 4,140 traps/km² in the site 3 (EM) during the period 2.

et al. 2003), and is also an extremely simple and easily adaptable device. The standard model (Fay & Eliason 1966, WHO 1995) has been improved by the addition of hay infusion (Reiter et al. 1991) and since then the egg trap has been modified in various ways to fit local needs, usually increasing its efficiency. Some examples are the addition of a mesh to prevent the escape of adult mosquitoes (Ai-leen & Song 2000) and a stick card to retain females (Ritchie et al. 2003). Furthermore, different types of egg substrates are used, such as wooden paddles of varying sizes (Swanson et al. 2000, Santos et al. 2003), seed germination cards used as a circular sheet or strips (Nasci et al. 2000, Polson et al. 2002, Hoeck et al. 2003, Barker et al. 2003) or cotton fabrics (Lenhart et al. 2005). Different types of containers with varying fluid capacities have also been used (Bellini et al. 1996, Swanson et al. 2000, Santos et al. 2003, Sant'Ana et al. 2006). The Municipality of Recife Health Department is currently using approximately 900 permanent ovitraps formed using disposable plastic bottles containing Bti as a larvicide, placed at strategic locations such as cemeteries, tyre storage areas and so forth.

This study has shown that the Bti-treated trap with an increased volume (2 l) and oviposition substrate area (225 cm²) can safely remain in the field for up to two months showing an egg-collection capacity (> 7,000 eggs/trap) capable of detecting not only slight but also large variations in the population size.

Continuous egg-collection at fixed sampling stations yielded more than four million eggs over a 52-week period in 464 sentinel ovitraps distributed over five sites. No association between *Aedes* population densities and the socio-economic status of the inhabitants was found, since the second highest vector density was observed precisely where people have the highest life quality (site 1) and the lowest densities at a site with low life quality (site 5). Due to the oviposition behaviour of *Aedes*, which is a colonizer of any kind of water-holding container, this is not a surprising finding. A similar observation has also been reported in other Brazilian cities as Salvador (Teixeira et al. 2002b, Morato et al. 2005), Manaus (Rios-Velasquez et al. 2007), and Rio de Janeiro (Maciel-de-Freitas et al. 2007). However, surprisingly, in Recife the PI for one of the districts (Casa Forte) in site 1 was negative during 2004 (Table). The possible reasons for this discrepancy could be the inaccuracy of the visual method for detecting larvae used for PI, and the resistance of high-income households to allowing health workers to inspect their premises. On the other hand, a clear association between demographic concentration and *Aedes* density is revealed by our data: the site the most infested by *Aedes* was the most densely populated (30,895 people/km²), while in the less infested area, human population density is eight times lower (3,737 people/km²).

At the intra-site level, egg counts allowed spots to be identified where the vector breeding population is consistently concentrated over the time, pointing out areas within the grid that should be considered as high priority for stepping up control activities. This observation suggests the importance of the environmental conditions at household level as a determinant of mosquito breeding activity, and providing indirect evidence that adult *Ae. aegypti* do not move far from the place where they emerge. This agrees with the observations of Harrington et al. (2005), showing that *Ae. aegypti* tend to be spatially clustered at the household level in places where human hosts and oviposition sites are abundant. Therefore, the use of spatial analysis techniques, such as the Kernel density estimator, to identify hotspots of vector concentration based on ovitrap data can be very useful for guiding control action.

According to Black and Moore (1996), density shifts in mosquito populations can be a result of regular seasonal climatic changes in temperature, moisture, resources or the emergence of new broods of adults. In the case of dengue vectors a sudden density increase after rainfall could be due to the appearance of a large number of larvae as a consequence of a massive hatching of eggs accumulated on container walls during a dry period. The first rainfalls occurring in Recife after the dry season, when temperatures are rising could mark the onset *Aedes* population growth resulting in substantially high densities observed from January to August. Differences between sites concerning the time of year when the *Aedes* population starts to grow may be attributed to differences in the environment, especially the main type of containers available for oviposition and their location in or around the home. Quantitative differences in rainfall between sites are being investigated as another possible cause, us-

ing pluviometers installed at each site. The association between climatic and other co-variables and the spatio-temporal distribution of *Ae. aegypti* population over a period of two years will be the subject of another article.

Although great efforts on the part of the government program to reduce the vector population through the systematic use of larvicides the epidemiological pattern of dengue cases in Brazil remains unchanged. According to Teixeira et al. (2002a, 2005) analysis of available data indicate limited effectiveness of vector control measures. Every year, the number of dengue cases increases considerably from January to June-July, decreasing steadily thereafter and remaining at a low endemic transmission level until December. Even when DENV-3 was introduced five years ago, in a context of total human susceptibility and well established *Ae. aegypti* populations everywhere, causing an explosive outbreak peaking in March, the seasonal pattern was maintained. This suggests that the vector density could be a strong determinant of dengue transmission intensity and also that vector abundance continues to be largely determined by seasonal climatic factors, indicating that efforts to control the vector are not showing apparent effects.

In Recife, where Bti has replaced temephos since the detection of *Aedes* population resistance to organophosphorous compounds in 2002, larvicidal cycles are regularly applied covering all 94 districts. However, the entomological data gathered during this study show high infestation levels in the sites studied and this may also be the case for the rest of the urban territory. For *r*-strategist species, like most mosquitoes, a very high proportion of individuals have to be killed to cause some impact on the target population (Schofield 1991). Due to the large number of site types colonized by *Ae. aegypti* in urban spaces it is very difficult to reach and treat most of them. The active participation of the community in control programs is essential to reduce the number of potential *Ae. aegypti* breeding sites. This has been demonstrated by a successful program based on biological control and collection of discarded containers by communal health workers in Vietnam (Kay & Nam 2005), as well as by community involvement in Cuba (Spiegel et al. 2002, Toledo-Romani et al. 2006). Unfortunately, such well-structured community involvement "is more difficult to establish and maintain in societies with a strong culture of individualism" (Hales & Panhius 2005).

We hypothesized that directing control measures simultaneously against two mosquito phases could help to reduce *Ae. aegypti* population. According to our results, stepping up control action by integrating egg mass collection and larvicide treatment of water containers could be a promising strategy. The aim was to prevent mosquito population outbreak hypothetically associated with the increase of dengue cases from January to May. Results showed that this goal could be achieved depending on the number of eggs destroyed. It is worth pointing out that, as C-OVT were treated with Bti and kept in the same place for 2-month cycles, a large number of larvae originating from eggs laid in the paddles have also been killed. At site 3, where more than 4,000 C-OVT/km² were placed, the population growth observed in other sites between January-April 2005 did not

58 Detection of Aedes population outbreaks * Leda Regis et al.

occur, indicating that vector population boosts can be prevented through this control strategy.

Some aspects relating to the feasibility of incorporating these surveillance and control strategies in large-scale programs, such as automatic estimation of the number of eggs in paddles, and operational costs are being taken into consideration and will be published elsewhere. An egg counting computer-assisted system developed by AFR Araújo and collaborators from the Informatic Center, Federal University of Pernambuco will be soon available. The automatic incorporation of these data into a geographic information system allows producing risk surface maps, using spatial statistics methods available in the open source public domain software Terraview, as an important tool for epidemiological and entomological surveillance activities.

There can be no doubt that mass adult collection as a complement to the use of larvicides could produce a faster impact on *Ae. aegypti* populations, provided an adult trap as efficient, simple and economical as this modified ovitrap is available. In recent years, traps for adult collection have been developed and evaluated under field conditions showing good potential for monitoring *Aedes* populations (Maciel-de-Freitas et al. 2006, Williams et al. 2006, Facchinelli et al. 2007, Gama et al. 2007).

Finally, it is important to draw attention to the strategy of calling for a network of multi-institutional and multi-disciplinary components with integrated use of spatially aware information technology in pursuit of a common goal. This strategy was designed to help increase the competence of the control of transmissible diseases, by providing new tools for surveillance and control systems, including environmental aspects, risk factor detection, and automatic warning methods. It should provide more efficient outbreak detection.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the fieldwork and laboratory staffs from the Secretaria de Saúde do Recife/CVA and CPqAM/Fiocruz. To the people of the Engenho do Meio, Brasília Teimosa, Morro da Conceição, Alto José do Pinho, Sítio dos Pintos, Dois Irmãos, Casa Forte and Parnamirim districts for their collaboration.

REFERENCES

- Ai-leen TG, Song RJ 2000. The use of GIS in ovitrap monitoring for dengue control in Singapore. *Dengue Bull* 24: 110-116.
- Araújo AP, Melo-Santos MAV, Carlos SO, Rios EMM, Regis L 2007. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar *israeliensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol Control* 41: 339-347.
- Bailey TC, Gatrell AC 1995. *Interactive Spatial Data Analysis*, Prentice Hall, Harlow, England, 414 pp.
- Barker CM, Paulson SL, Cantrell S, Davis BS 2003. Habitat preference and phenology of *Ochlerotatus triseriatus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southwestern Virginia. *J Med Entomol* 40: 403-410.
- Bellini R, Carriero M, Burgio G, Bacchi M 1996. Efficacy of different ovitraps and binomial sampling in *Aedes albopictus* surveillance activity. *J Am Mosq Control Assoc* 12: 632-636.
- Benjamin S, Rath A, Chiang YF, Lee HL 2005. Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israeliensis* tablet formulation, VectoBac DT®, for control of dengue vectors in potable water containers. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 879-892.
- Black WC, Moore CG 1996. Population biology as a tool for studying vector-borne disease. In BJ Beary, WC Marquardt, *The Biology of Disease Vectors*, University Press of Colorado, USA, p. 393-416.
- Braga IA, Gomes AC, Nelson M, Mello RCG, Bergamaschi DP, Souza JMP 2000. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição para detecção de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 347-353.
- Clements AN 1992. *The Biology of Mosquitoes*, Vol. I, Chapman and Hall, London, 536 pp.
- Facchinelli L, Valerio L, Pombi M, Reiter P, Constantini C, Della Torre A 2007. Development of a novel sticky trap for container-breeding mosquitoes and evaluation of its sampling properties to monitor urban populations of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 21: 183-195.
- Fay RW, Elison DA 1966. A preferred oviposition site as surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq News* 26: 531-535.
- Gama RA, Silva EM, Silva IM, Resende MC, Eiras AE 2007. Evaluation of the sticky MosquiTRAP™ for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) during the dry season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Neotrop Entomol* 36: 294-302.
- Hales S, Panhius W 2005. A new strategy for dengue control. *Lancet* 365: 551-552.
- Harrington LC, Scott TS, Lerdthusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, Jones JJ, Kitthawee S, Kittayapong P, Sithiprasasna R, Edman J 2005. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am J Trop Med Hyg* 72: 209-220.
- Hoecck PAE, Ramberg FB, Merrill SA, Moll C, Hagedorn HH 2003. Population and parity levels of *Aedes aegypti* collected in Tucson. *J Vector Ecol* 28: 1-9.
- Kay B, Nam VS 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet* 365: 613-617.
- Lenhart AE, Walle M, Cedillo H, Kroeger A 2005. Building a better ovitrap for detecting *Aedes aegypti* oviposition. *Acta Trop* 96: 56-59.
- Maciel-de-Freitas R, Eiras AE, Lourenço-de-Oliveira R 2006. Field evaluation of the BG-sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 321-325.
- Maciel-de-Freitas R, Marques WA, Peres RC, Cunha SP, Lourenço-de-Oliveira R 2007. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district of Rio de Janeiro during dry and wet seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 489-496.
- Monteiro AMV, Carvalho MS, Assunção R, Souza WV, Ribeiro Jr PJ, Davis Jr C, Regis L, the SAUDAVEL Project Team 2005. SAUDAVEL: Bridging the Gap between Research and Services in Public Health Operational Programs by Multi-Institutional Networking Development and Use of Spatial Information Technology Innovative Tools. [cited 2008 Jan 10]. Available from: <http://www.dpi.inpe.br/saudavel/publicacoes.html>.
- Morato VCG, Teixeira MG, Gomes AC, Bergamaschi DP, Barreto M 2005. Infestation of *Aedes aegypti* estimated by oviposition traps in Brazil. *Rev Saude Publica* 39: 553-558.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chompoonsi J 2004. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *J Am Mosq Control Assoc* 20: 64-73.
- Nasci RS, Moore CG, Biggerstaff BJ, Pannella NA, Liu HQ, Karabat-

- sos N, Davis BS, Brannon ES 2000. La Crosse encephalitis virus habitat association in Nicholas County, West Virginia. *J Med Entomol* 37: 559-570.
- Poison KA, Curtis C, Seng CM, Olson JG, Chantha N, Rawlins SC 2002. The use of ovitraps baited with hay infusion as a surveillance tool for *Aedes aegypti* mosquitoes in Cambodia. *Dengue Bull* 26: 178-184.
- Regis L, Oliveira CMF, Silva-Filha MH, Silva SB, Maciel A, Furtado AF 2000. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 488-492.
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol* 17: 377-380.
- Reiter P, Amador MA, Colon N 1991. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 52-55.
- Rios-Velasquez CM, Codeço CT, Honório NA, Sabrosa PS, Moresco M, Cunha ICL, Levino A, Toledo LM, Luz SLB 2007. Distributions of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 617-623.
- Ritchie SA, Long S, Hart A, Webb CE, Russell RC 2003. An adulticidal sticky ovitrap for sampling container-breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 19: 235-242.
- Sant'Ana AL, Roque RA, Eiras AE 2006. Characteristics of grass infusion as oviposition attractants to *Aedes* (*Stegomyia*) (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 43: 214-220.
- Santos SRA, Melo-Santos MAV, Regis L, Albuquerque CMR 2003. Field evaluation of ovitraps associated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to determine oviposition rates. *Dengue Bull* 27: 156-162.
- Schofield C 1991. Vector population responses to control intervention. *Ann Soc Belg Med Trop* 71: 201-217.
- Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GC, Strickman D, Kittayapong P, Edman JD 2000. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. *J Med Entomol* 37: 89-101.
- Setha T, Chantha N, Socheat D 2007. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis*, Vectobac® WG and DT formulations against dengue mosquito vectors in cement potable water jars in Cambodia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 261-268.
- Spiegel J, Yassi A, Tate R 2002. Dengue in Cuba: mobilization against *Aedes aegypti*. *Lancet Infect Dis* 2: 207-208.
- Stoops CA 2005. Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). *J Vector Ecol* 30: 41-44.
- Swanson J, Lancaster M, Anderson J, Crandell M, Hamaris L, Grimstad P, Kitron U 2000. Overwintering and establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban La Crosse virus enzootic site in Illinois. *J Med Entomol* 37: 454-460.
- Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Ferreira LDA, Vasconcelos PFC 2002a. Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. *Rev Bras Epidemiol* 5: 108-115.
- Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Ferreira LDA, Vasconcelos PFC, Cairncross S 2002b. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemics in a complex urban area. *Trop Med Int Health* 7: 757-762.
- Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Mota E 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance and control experiences? *Cad Saude Publica* 21: 1307-1315.
- Toledo-Romani ME, Baly-Gil A, Ceballos-Ursula E, Boelaert M, Stuyf PV 2006. Participación comunitaria en la prevención del dengue: un abordaje desde la perspectiva de los diferentes actores sociales. *Salud Publica Mex* 48: 39-44.
- WHO- World Health Organization 1995. Guidelines for Dengue surveillance and mosquito control. *Western Pacific Edu Actions* 8, 104 pp.
- Williams CR, Long SA, Russell RC, Ritchie SA 2006. Field efficacy of the BG-sentinel compared with CDC backpack aspirators and CO₂-baited traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 296-300.

ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos CPqAM/Fiocruz.



Comitê de Ética em Pesquisa

Título do Projeto: "Aedes aegypti: estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da Região Metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007"

Pesquisador responsável: Maria Alice Varjal de Melo Santos

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ - NESC

Data de apresentação ao CEP: 28/05/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 37/07

Registro no CAAE: 0037.0.095.000-07

PARECER Nº 021/2007

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 13 de junho de 2010. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de junho de 2007.



Dr. Zulmira Maria de Medeiros
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:
Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 13/06/2008.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br



Centro de Pesquisas
AGGEU
MAGNÍFIAS



FIOCRUZ
Ministério da Saúde