Manual de Entomologia da Malária

Para Técnicos de Entomologia e Controlo de Vetores (Nível Básico)

Setembro de 2012

Esta publicação foi produzida para revisão pela Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID). Foi preparada pelo RTI International.

USAID FROM THE AMERICAN PEOPLE

PRESIDENT'S MALARIA INITIATIVE

RTI INTERNATIONAL

Pan American Health Organization

Regional Office of the World Health Organization

Manual de Entomologia da Malária

Para Técnicos de Entomologia e Controlo de Vetores (Nível Básico)

Integrated Vector Management of Malaria and Other Infectious Diseases Task Order 2
Contrato GHA-I-02-04-00007-00

Produzido para
Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID)

Autores
Jacob Williams
RTI International
3040 Cornwallis Road
Post Office Box 12194
Research Triangle Park, NC 27709-2194

e

João Pinto
Unidade de Parasitologia Médica/CMDT.LA
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa
Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal

O RTI International é um instituto líder em investigação no mundo, dedicado a melhorar a condição humana, transformando o conhecimento em prática. A nossa equipa, superior a 2800 profissionais, providencia conhecimentos técnicos e científicos a governos e empresas de mais de 40 países, nas áreas da saúde e de produtos farmacêuticos, educação e formação, inquéritos e estatísticas, tecnologia avançada, desenvolvimento internacional, política económica e social, energia e meio ambiente, e serviços de laboratório e química. Para mais informações, visite www.rti.org.

RTI International é uma marca comercial do Research Triangle Institute.

As opiniões dos autores expressas nesta publicação não refletem necessariamente a opinião da agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional ou do Governo dos Estados Unidos.

Agradecimentos

Agradecemos a J. Derek Charlwood (Liverpool School of Tropical Medicine) e Carla A. Sousa (Instituto de Higiene e Medicina Tropical-IHMT), por terem contribuído com fotos para o manual.

Os seguintes colaboradores providenciaram uma revisão crítica dos conteúdos do manual: Maria Paz Ade (Organização Pan-Americana da Saúde-OPAS/OMS), Allison Belemvire (USAID), Keith Carter (Organização Pan-Americana da Saúde-OPAS/OMS), Gracella W. Cooper (Programa Nacional de Controlo da Malária da Libéria), Rainier Escalada (Organização Pan-Americana da Saúde-OPAS/OMS), Christen Fornadel (USAID), Christian Frederickson (Organização Pan-Americana da Saúde-OPAS/OMS), John Githure (RTI International), Michael Macdonald, Jake O'Sullivan (RTI International), Norma Padilla (Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala), Carla A. Sousa (IHMT), Marco Fidel Suarez, Kathryn Welter (RTI International) e Susan Youll (USAID).

ÍNDICE

Page

Agradecimentos iii

Lista de Figuras vi

Lista de Tabelas vii

Introdução 1

Objetivo do manual 1

Público-alvo do manual 2

Lista de Termos Úteis 4

Unidade 1 Controlo da Malária e o Papel da Entomologia 6

1.1 Principais componentes dos programas de controlo da malária 6

1.2 Educação comunitária 9

1.3 Princípios básicos de planeamento do controlo de vetores e o papel da entomologia 9

Unidade 2 Biologia de Vetores de Malária 12

2.1 Malária 12

2.2 Ciclo de vida do mosquito *Anopheles* 12

2.3 Habitats larvares e fatores que afetam a produção de adultos 15

2.4 Características de importância médica nos adultos 17

Unidade 3 Anatomia e Identificação de Mosquitos 18

3.1 Como distinguir os ovos de anofelíneos de outros culicíneos 18

3.2 Como distinguir entre larvas de anofelíneos e culicíneos 19

3.3 A pupa 20

3.4 Como distinguir entre anofelíneos e culicíneos adultos 21

3.5 Métodos de identificação de espécies de mosquitos 23

Unidade 4 Diversidade de Vetores de Malária 25

4.1 Complexos de espécies gémeas 25

4.2 Vetores de malária nas Américas 26

4.3 Vetores de malária em África 27

4.4 Vetores de malária na Ásia 29

Unidade 5 Colheita de Mosquitos (Larvas) 31

5.1 Métodos de colheita 32

5.2 Registos de colheita 34
5.3 Transporte de larvas vivas 35
5.4 Conservação de amostras 35
5.5 Estimativas de parâmetros larvares 35
Unidade 6 Colheita de Mosquitos (Adultos) 37
6.1 Colheita de mosquitos adultos 37
6.2 Registos de colheita 44
6.3 Conservação de amostras 44
Unidade 7 Preparação e Conservação de Amostras de Mosquitos 45
7.1 Principais técnicas laboratoriais 45
7.2 Preparação de amostras de mosquitos 47
7.3 Equipamentos e materiais essenciais 48
7.4 Boas práticas laboratoriais 49
Unidade 8 Índices de Transmissão e Fatores que Afetam a Transmissão da Malária 50
8.1 Determinar se uma espécie de mosquito transmite malária 50
8.2 Técnicas para incriminação de vetores 51
8.3 Estimativa de índices de transmissão 53
8.4 Fatores que afetam a transmissão da malária 57
Unidade 9 Noções Básicas de Criação de Colónias de Mosquitos no Laboratório 58
9.1 O insectário: procedimentos básicos 58
9.2 Condições gerais de criação de mosquitos 60
Unidade 10 Testes de Suscetibilidade Aos Inseticidas e Bioensaios de Cone 64
10.1 Porquê determinar a suscetibilidade de vetores de malária aos inseticidas? 64
10.2 Preparação amostras de mosquitos para testes de suscetibilidade e bioensaios de cone 65
10.3 Determinação da suscetibilidade de mosquitos adultos 65
10.4 Eficácia residual de inseticidas em superfícies pulverizadas (WHO, 1998, 2005) 69
Anexo I Exemplo de um Programa do Curso Básico de Técnicos de Entomologia 72
Anexo II Exemplos de Fichas de Campo para Colheitas de Larvas e Adultos de Mosquito 80

Lista de Figuras

Figura 1. Fases do ciclo de vida do mosquito *Anopheles* 13
Figura 2. Machos de *Anopheles* formam enxames ao final da tarde para acasalar 15
Figura 3. Tipos de criadouros larvares de mosquitos 16
Figura 4. Exemplos de ovos de *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* 19
Figura 5. Morfologia de uma larva de *Anopheles* 19
Figura 6. Diferenças entre larvas de anofelíneos e culicíneos 20
Figura 7. Pupa de *Anopheles* 21
Figura 8. Anatomia de um mosquito adulto 22
Figura 9. Diferenças na cabeça do macho e da fêmea de anofelíneos e culicíneos 22
Figura 10. Posição de repouso de mosquitos anofelíneos e culicíneos adultos 23
Figura 11. Principais materiais e equipamentos necessários para a colheita de larvas 32
Figura 12. Colheita de larvas com caço 33
Figura 13. Colheita de larvas com pipeta 34
Figura 14. Principais materiais para colheita manual de mosquitos 38
Figura 15. Colheita sobre humanos 39
Figura 16. Colheita com lençol e piretrina 41
Figura 17. Colheita de mosquitos em repouso no exterior 42
Figura 18. Colheita manual de mosquitos em repouso no interior 43
Figura 19. Armadilha de saída 43
Figura 20. Aparência do abdómen de um mosquito fêmea consoante o seu estado gonotrófico 52
Figura 21. Imagem de um insectário mostrando tinas com larvas e gaiolas com adultos 59
Figura 22. Tina de larvas com ovos e larvas L1 61
Figura 23. Separação de larvas e pupas com uma pipeta 63
Figura 24. Seleção de resistência aos inseticidas numa população de vetores 65
Figura 25. Testes de tubo da OMS para avaliar a suscetibilidade a inseticidas 66
Figura 26. Revestimento dos tubos com papéis impregnados 67
Figura 27. Bioensaio de cone da OMS aplicado numa parede 69
Figura 28. Bioensaio de cone da OMS num mosquiteiro tratado 71

Lista de Tabelas

Tabela 1. Métodos de controlo de vetores de malária (adaptado de WHO, 2006) 7

Tabela 2. Requisitos para a implementação bem-sucedida dos principais métodos de controlo de vetores (adaptado de WHO, 2006) 9

Tabela 3. Conservação de partes do corpo de mosquitos a serem usadas em técnicas laboratoriais 48

Introdução

A malária continua a ser uma das principais causas de morte e doença na maior parte das regiões tropicais do mundo, sendo endémica em 106 países. Em 2010, cerca de 81% dos 216 milhões de casos de malária ocorreram em África e cerca de 13% no sudeste asiático[1]. A maior proporção (91%) das 665 000 mortes anuais que se estima serem provocadas por malária ocorre em África, afetando, principalmente, crianças com menos de cinco anos de idade (86%). Na região das Américas, em 2010, foram registados mais de 670 000 casos de malária e reportados 133 óbitos atribuídos a esta doença. A transmissão da doença está ativa em 21 países, colocando cerca de 20% da população das Américas em risco. A malária impõe ainda graves constrangimentos ao desenvolvimento económico, sendo uma importante causa de pobreza na maioria dos países onde é endémica.

Embora tenha havido um aumento acentuado no financiamento para o controlo da malária, as metas de redução da doença, estabelecidas pelo programa *Roll Back Malaria*[2] e pelos Programas Nacionais de Controlo, ainda permanecem por atingir em muitos países. Isto é em parte devido a limitações na capacidade de geração de conhecimento adequado sobre a epidemiologia local da doença, no qual se possa basear a implementação e gestão custo-efetiva do programa. Em particular, a capacidade de vigilância e monitorização entomológica é ainda rudimentar em muitos países endémicos. Há uma necessidade urgente nos Programas Nacionais de Controlo da Malária, de criar um número suficiente de quadros qualificados, para participar efetivamente nas atividades de controlo.

Objetivo do manual

Um curso de formação de dois níveis foi desenvolvido para técnicos de entomologia, visando apoiar o fortalecimento de competências essenciais para a monitorização e vigilância entomológica em países endémicos. Este manual destina-se a apoiar o nível básico (nível-1) do curso de entomologia, abrangendo:

1. O ciclo de vida, a bioecologia e comportamento dos mosquitos;
2. Amostragem de larvas e adultos, identificação de mosquitos e incriminação de vetores de malária;
3. Principais índices de transmissão de malária e o seu significado;
4. O controlo de vetores de malária e as principais intervenções atuais;
5. O papel da entomologia no controlo de vetores;
6. Princípios básicos da criação de mosquitos no laboratório;

[1] WHO (2009). World Malaria Report 2011. World health Organization. Geneva, Switzerland (http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/)
[2] Roll Back Malaria – Global Malaria Partnership (http://www.rbm.who.int/index.html)

7. Testes de suscetibilidade de mosquitos e eficácia residual dos inseticidas usados no controlo de vetores.

Este manual descreve os elementos básicos que são fundamentais para atingir os objetivos de ensino, em cada área temática. No entanto, é previsto que o curso de formação proporcione oportunidades alargadas para trabalho de campo, de modo a garantir uma experiência completa de aprendizagem e consolidar competências práticas. As metodologias de ensino compreendem um formato participativo, em que os alunos são encorajados a desenvolver os conteúdos por si próprios e em grupo. Um modelo de currículo e calendário para o curso básico de técnicos de entomologia é apresentado no Anexo I.

Público-alvo do manual

Este manual é direcionado ao pessoal distrital de países endémicos de malária, que normalmente formam os quadros que colhem informação sobre indicadores entomológicos locais e os relatam aos programas de controlo de vetores. Estes trabalhadores têm normalmente o nível secundário de educação ou um diploma de especialização numa área de estudos que se presta à formação em entomologia.

Leituras adicionais

Este manual foi elaborado com base em diversos relatórios, manuais e artigos publicados, os quais se recomenda a leitura:

1. Benedict M (2009). *Methods in Anopheles research*. Malaria Research and Reference Reagent Center. Version 3. 264 pp
2. Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC, Benz D, Gething, PW, Howes RE, Patil AP, Temperley WH, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T, Elyazar IR, Harbach RE, Hemingway J, Manguin S, Mbogo CM, Rubio-Palis Y, Godfray HC (2010) Developing global maps of the dominant *Anopheles* vetors of human malaria. *PLoS Medicine* 7: e1000209.
3. Manguin S, Garros C, Dusfour I, Harbach RE, Coosemans M (2008). Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: an updated review. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 489-503.
4. Service MW, Townson H (2002). The *Anopheles* vector. In: *Essential Malariology*. Eds: DA Warrell and HM Gilles. 4th Ed. Arnold Publishers, London, UK. 348 pp.
5. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vetors* 3: 72.

6. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Okara RM, Van Boeckel T, Godfray HC, Harbach RE, Hay SI (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vetors* 3: 117.
7. WHO (1975). *Manual on practical entomology in malaria.* World Health Organization, Geneva Switzerland. 160 pp.
8. WHO (1992). *Entomological field techniques for malaria control. Part I: learner's guide*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 77 pp.
9. WHO (1998). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces*. World Health Organization, Geneva Switzerland. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12
10. WHO (2002). *Manual for residual spraying: Application of residual sprays for vector control.* World Health Organization, Geneva, Switzerland. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2000.3
11. WHO (2004). *Malaria control in the WHO African Region. Turning resources into results. 2003 Annual Report.* WHO Regional Office for Africa, Harare, Zimbabwe. 44pp.
12. WHO (2003b). *Malaria entomology and vector control: Learner's guide*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. WHO/CDS/CPE/SMT/2002.18 Rev.1
13. WHO (2005). *Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets.* World Health Organization, Geneva, Switzerland. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11
14. WHO (2006). *Malaria vector control and personal protection*. World Health Organization Technical Report Series, n° 936, Geneva, Switzerland. 62 pp.
15. WHO (2009). 2008 *World Malaria Report*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. WHO/HTM/GMP/2008.1

Lista de Termos Úteis

Anticorpos: São proteínas (chamadas imunoglobulinas) que são utilizadas pelo sistema imunitário para reconhecer e neutralizar substâncias estranhas no interior do corpo, tais como vírus, bactérias ou parasitas.

Antropogénico: Refere-se a qualquer efeito, ou resultado, que se relacione com o impacto da atividade humana na natureza.

Ciclo esporogónico: Esta é a parte do ciclo de vida do parasita da malária que se desenvolve no interior do mosquito. Inicia-se quando o mosquito fêmea faz uma refeição de sangue num humano (ou outro vertebrado) infetado. No interior do estômago do mosquito, as formas sexuais do parasita (gametócitos) unem-se para formar um ovo (oocineto), que se desloca para a parede celular do estômago. O oocineto desenvolve-se em oocisto na parede do estômago. Dentro do oocisto, os esporozoítos são formados por um processo de divisão celular (meiose). O oocisto então rebenta, libertando os esporozoítos que, então, se deslocam para as glândulas salivares, invadindo-as. Uma vez nas glândulas salivares, os esporozoítos serão transmitidos a um hospedeiro humano na próxima vez que o mosquito picar e se alimentar de sangue. Existem alguns fármacos antimaláricos que são específicos de certas fases do parasita durante o ciclo esporogónico. Fármacos **gametocitocidas** matam gametócitos e fármacos **esporontocidas** matam esporozoítos. Um exemplo de um fármaco com estes dois tipos de ação é a primaquina.

Citogenética: Estudo da estrutura e função dos cromossomas (estruturas hereditárias que transportam os genes que determinam o sexo e as características de um organismo). Quando a citogenética é aplicada à identificação e ao estudo das relações entre espécies biológicas, é designada por **citotaxonomia**.

Cromossomas politénicos: São cromossomas gigantes, constituídos por múltiplas cópias do material genético de que são compostos. Estes cromossomas gigantes ocorrem apenas em certas células de insetos. Devido ao seu tamanho, os cromossomas politénicos são muito úteis para análise citogenética.

Dimorfismo sexual: São as diferenças que permitem distinguir machos e fêmeas da mesma espécie.

Epidemiologia: Estudo da distribuição, padrões e determinantes das características de saúde das populações, e de eventos relacionados (tais como doenças), e também como este conhecimento é aplicado no controlo de doenças e problemas de saúde.

Espécie biológica: Grupo de populações, ou organismos de uma população, que se reproduzem entre si na natureza e produzem descendentes férteis.

Espiráculos: Aberturas circulares no corpo dos insetos que permitem a entrada de ar no interior do corpo.

Esporozoíto: Esta é a fase do ciclo de vida do parasita da malária no mosquito, que é capaz de produzir infeção em humanos (ou em outros hospedeiros vertebrados). Assim, é a fase do parasita da malária que é **infetante** para os humanos. Os esporozoítos são encontrados nas glândulas salivares do mosquito fêmea. A parede celular externa do esporozoíto é coberta por uma proteína específica denominada **proteína circunsporozoítica**. É esta proteína que é detetada no laboratório a fim de se determinar se um mosquito é infetante (*i.e.* transmite o parasita da malária quando pica).

Estivação: Estado de dormência e inatividade que os organismos passam para sobreviver às temperaturas elevadas e condições áridas impostas pela estação quente.

Material genético: Este é o material biológico que se encontra presente em todos os organismos vivos e que pode ser transmitido de uma geração para a seguinte (hereditário). O material genético (também chamado ADN, ou ácido desoxirribonucleico) determina a estrutura e a função das células que formam um organismo. Um **gene** é uma sequência particular do material genético que determina uma proteína específica. Na célula, o material genético está organizado em estruturas chamadas **cromossomas**.

Morfologia: Este termo refere-se ao tamanho, forma e estrutura dos organismos, ou das partes do corpo que os constituem (internas e externas). O termo **anatomia** é frequentemente utilizado no lugar de morfologia, na medida em que estuda a organização e estrutura dos organismos.

Mutação genética: Este termo refere-se a qualquer alteração na sequência de nucleótidos (elementos bioquímicos do material genético ou ADN) de um determinado gene. Estas alterações podem resultar em modificações na proteína que o gene codifica. Os organismos portadores da mutação são chamados mutantes, em oposição aos indivíduos tipo-selvagem.

Paridade: número de vezes que uma fêmea tem filhos. Um mosquito fêmea que colocou ovos pelo menos uma vez na vida é chamado de **parida**. As fêmeas que ainda não tenham posto ovos são chamadas de **nulíparas**.

Proteínas: São compostos bioquímicos (moléculas) que constituem as células de organismos vivos. As proteínas desempenham um papel em todas as funções biológicas.

Unidade 1
Controlo da Malária e o Papel da Entomologia

Objetivos de aprendizagem

Esta unidade tem como objetivo fornecer conhecimentos básicos sobre:

- **As estratégias atuais usadas para controlar a malária.**
- **As principais medidas de controlo do vetor;**
- **O papel da entomologia no controlo da malária;**
- **Os fatores importantes a serem considerados no planeamento do controlo de vetores da malária.**

1.1 Principais componentes dos programas de controlo da malária

Os programas de controlo da malária, normalmente, incluem três componentes básicos:

- A deteção precoce e o tratamento eficaz dos casos de malária;
- O controlo do(s) mosquito vetor(es);
- A educação comunitária.

Diagnóstico precoce e tratamento eficaz dos casos de malária

O uso de medicamentos (fármacos antimaláricos) contra a malária é a principal ferramenta disponível para reduzir as populações de parasitas. Além do tratamento e profilaxia, fármacos gametocitocidas e esporontocidas afetam o desenvolvimento esporogónico do parasita no mosquito e, assim, a transmissão da malária.

Atualmente, a maioria dos programas de controlo da malária têm adotado estratégias de deteção precoce e tratamento imediato dos casos de malária. Estas estratégias implicam a implementação de centros de distribuição de medicamentos e de postos de diagnóstico rápido, ao nível do sistema de cuidados de saúde primário. Para ser mais eficaz, as pessoas em risco de contrair malária precisam de conhecer os sintomas da malária e estarem prontas para procurar o tratamento adequado. A colocação de pessoas com formação dentro da comunidade (p. ex. trabalhadores comunitários de saúde), para ajudar a identificar a malária e facilitar o acesso a um tratamento eficaz, é considerada essencial para que os pacientes recebam tratamento imediato.

No entanto, vários problemas podem minar estas estratégias. Obstáculos referentes à acessibilidade de fármacos são uma realidade comum. Além disso, existem problemas de fraca adesão ao tratamento, relacionados com razões económicas e com os efeitos secundários de alguns fármacos. Como resultado, os regimes terapêuticos, frequentemente, não são concluídos, aumentando o risco de surgimento de resistências aos fármacos. O aumento e

propagação da resistência aos antimaláricos, tais como a cloroquina e pirimetamina/sulfadoxina (Fansidar®), é um grande obstáculo para a sustentabilidade da componente parasitológica dos programas de controlo da malária.

Controlo de vetores e princípios para uma implementação efetiva

O controlo de vetores é um elemento importante da Estratégia Global de Controlo da Malária da Organização Mundial de Saúde (OMS). Continua a ser a forma mais eficaz de prevenir a transmissão da malária. O controlo de vetores da malária envolve medidas para reduzir o contato entre o(s) vetor(es) e os seres humanos, e para reduzir o número de mosquitos que chegam à fase em que podem transmitir o parasita (fase infetante). Se tal for feito eficazmente, diminui-se a transmissão do parasita, o que reduz o número de pessoas que contraem malária.

O controlo de vetores de malária envolve métodos que podem ser classificados em duas categorias gerais, apresentadas na Tabela 1. Estes métodos são, na sua maioria, baseados em inseticidas.

Tabela 1. Métodos de controlo de vetores de malária (adaptado de WHO, 2006)

Método	Ação	Para proteção individual ou familiar	Para proteção comunitária
Controlo de vetores adultos	Redução do contato humano-mosquito	Redes tratadas com inseticida, repelentes, vestuário protetor, colocação de telas de rede e outros melhoramentos nas casas	Redes tratadas com inseticida, zooprofilaxia
	Eliminação de mosquitos adultos		Redes tratadas com inseticida, pulverizações intradomiciliares, termonebulizações, pulverizações de ultrabaixo volume
Controlo larvar (manejo de criadouros larvares)	Eliminação de larvas de mosquitos	Saneamento peridoméstico	Aplicação de larvicidas em corpos de água, irrigação intermitente, construção de canais artificiais, controlo biológico
	Redução de fontes	Drenagens em pequena escala	Saneamento ambiental, manejo da água, drenagem

Os principais métodos de controlo de vetores atualmente implementados em programas de controlo da malária incluem estratégias direcionadas aos adultos e aos imaturos.

- **Manejo de Criadouros Larvares (sigla em inglês LSM):** Estes métodos visam reduzir o número de vetores que atingem a fase adulta. O LSM pode ser uma boa intervenção complementar em situações de elevada densidade de populacional de mosquitos, com um número reduzido de habitats larvares bem delimitados, tais como em regiões áridas (Tabela 2). Os métodos de LSM podem envolver:

- Inseticidas químicos (p. ex. Temephos), agentes biológicos (p. ex. bactérias como o *Bacillus thuringiensis israelensis - Bti*) ou toxinas que matam larvas e pupas;
- Peixes larvívoros tais como *Gambusia affinis* e guppy (*Poecilia reticulata*);
- A aplicação de óleos que formam uma película sobre a água que impede que as larvas e pupas respirem;
- O uso de reguladores do crescimento dos insetos, que impedem as larvas de se desenvolverem até à fase de adulto;
- A manipulação ou eliminação física de habitats larvares para impedir a reprodução do mosquito. Quando as alterações são permanentes (p. ex. drenagens, preenchimento de valas), designam-se por modificações ambientais.

- **Pulverização Residual Intradomiciliar (sigla em inglês IRS):** Este método tem como alvo o mosquito adulto. Consiste na pulverização das paredes interiores das casas com inseticidas, aprovados pela OMS, que apresentam propriedades residuais. Uma vez aplicado, o inseticida vai secar deixando uma película de pequenos cristais na parede. O vetor entra em contato com o inseticida quando repousa na parede, antes ou após uma refeição de sangue, e morre se for suscetível ao inseticida. Alguns dos inseticidas utilizados em IRS também são capazes de repelir os mosquitos, o que reduz o número de vetores que entram nas divisões das casas pulverizadas.
- **Redes (mosquiteiros) Tratadas com Inseticida (sigla em inglês ITN):** Este método também tem como alvo o mosquito adulto. O mosquiteiro fornece uma barreira eficaz entre a pessoa que dorme protegida com ele e o mosquito vetor. Isto reduz a possibilidade de picada e infeção. O inseticida, impregnado no mosquiteiro, atua para matar e/ou repelir qualquer vetor suscetível que repouse na rede. Atualmente, existem redes tratadas com inseticidas de longa duração (sigla em Inglês **LLIN**) que têm uma vida útil de cerca de 2-3 anos de uso. Em geral, os programas de controlo colocam como meta de distribuição de mosquiteiros uma cobertura maior ou igual a 80% da população em risco numa dada área, uma vez que já foi demonstrado que tal cobertura proporciona um efeito de comunidade.

A eficácia de cada método de controlo depende de uma série de variáveis, que incluem características bioecologias dos mosquitos vetores, características de habitat da região e aspetos socioeconómicos/culturais da população humana. A Tabela 2 apresenta alguns dos requisitos essenciais para o uso bem-sucedido dos três principais métodos de controlo de vetores.

Tabela 2. Requisitos para a implementação bem-sucedida dos principais métodos de controlo de vetores (adaptado de WHO, 2006)

Intervenção	Condições necessárias
Pulverização Residual Intradomiciliar	• Vetores repousam predominantemente no interior (espécies endofílicas) • Casas com paredes e tetos • A população protegida não é nómada (domicílios permanentes) • Mobilização comunitária eficaz para maximizar a disponibilidade da população-alvo para aceitar a pulverização e cumprir com as normas de segurança • Capacidade do Programa Nacional para organizar a aplicação correta e atempada da intervenção em todas as casas das áreas a serem protegidas, incluindo informação sobre o número e localização das casas a serem pulverizadas
Redes Tratadas com Inseticida	• A maioria das picadas (e infeções de malária) é adquirida dentro de casa (espécies endofágicas) • Pelo menos parte das picadas do vetor ocorre durante as horas em que as pessoas estão a dormir • Mobilização comunitária eficaz para maximizar a disponibilidade das pessoas em usar corretamente os mosquiteiros • Um sistema adequado de entrega da mosquiteiros tratados, incluindo informações sobre o número e localização de casas, bem como do número de pessoas que precisam de mosquiteiro • Capacidade para organizar um programa de tratamento de redes, ou para passar a distribuir, de forma gratuita, redes tratadas com inseticida de longa-duração
Manejo de Criadouros Larvares	• Os vetores ocupam criadouros permanentes ou semipermanentes • Capacidade para localizar e mapear a maioria dos criadouros larvares, numa área que reflita o alcance de voo do mosquito dentro da comunidade a ser intervencionada • Seleção apropriada de medidas antilarvares • Participação comunitária na redução e eliminação de criadouros

1.2 Educação comunitária

As intervenções de controlo de vetores devem ter uma forte componente de participação social, que normalmente visa motivar a proteção pessoal e familiar e que inclui a educação em saúde e a mobilização comunitária.

Os métodos destinados a reduzir o contato humano-vetor implicam muitas vezes uma mudança nos hábitos humanos. Programas educacionais com foco no uso correto de mosquiteiros e outras medidas de proteção individual, no saneamento e sobre a necessidade de terapêutica correta, são geralmente implementados com os programas de controlo.

1.3 Princípios básicos de planeamento do controlo de vetores e o papel da entomologia

Apesar da eficácia dos atuais métodos de controlo, a prevalência da malária continua elevada em muitas regiões. Embora tenha havido um aumento significativo no financiamento para o controlo da malária na maioria dos países endémicos (a partir de fontes externas e internas), os recursos dos Programas Nacionais ainda são, em geral, limitados.

As estratégias de controlo da malária devem ser baseadas em estudos epidemiológicos e entomológicos, que fornecem informações sobre os determinantes locais da doença. No entanto, a maioria dos países endémicos ainda enfrenta desafios significativos para planear e implementar medidas de controlo de vetores de uma forma eficaz. Infraestruturas e competências técnicas continuam a ser insuficientes. Além disso, em muitas regiões os vetores estão desenvolvendo resistência aos inseticidas.

A entomologia da malária envolve o estudo dos fatores biológicos, ecológicos e comportamentais que permitem ao mosquito vetor transmitir os parasitas da malária, de uma pessoa para outra. Permite a investigação sistemática sobre o porquê das medidas de controlo implementadas, poderem estar, ou não, funcionar. A entomologia é, portanto, fundamental para o planeamento e melhoramento das estratégias de controlo da malária.

Das questões que os estudos entomológicos vão responder, destacam-se:

- Identificar quais os mosquitos que estão presentes no local, e quais destas espécies são responsáveis pela transmissão da malária;
- O comportamento (p. ex. hábitos de picada e repouso) e os habitats de reprodução (criadouros) das espécies de vetores: por exemplo, se os vetores se alimentam de sangue de outros animais para além dos humanos; ou qual a proporção de mosquitos que se alimenta no interior ou no exterior das habitações humanas;
- Se as intervenções que estão sendo implementadas estão a afetar os vetores e a sua capacidade de transmitir a malária. Os indicadores medidos incluem alterações na densidade populacional do vetor, taxas de infeção, níveis de suscetibilidade/resistência aos inseticidas em uso, e a ação residual de inseticidas sobre superfícies tratadas e em mosquiteiros impregnados.

Os programas de controlo de vetores apresentam melhores possibilidades de sucesso se forem planeados com base nos resultados destes estudos entomológicos. Finalmente, os programas de controlo de vetores devem ter em conta o custo-eficácia e a sustentabilidade das estratégias implementadas. Esforços devem ser feitos para reforçar progressivamente as capacidades locais para o planeamento, implementação, monitorização e avaliação destes programas.

Tipos de levantamentos entomológicos

Existem quatro tipos de levantamentos (pesquisas, rastreios) entomológicos:

- **Levantamentos preliminares:** Estes levantamentos são originais, básicos e de curta-duração. São usados para recolher dados de base, geralmente com a finalidade de planear uma intervenção de controlo. A ênfase destas pesquisas inclui a identificação das espécies vetoras, caracterização de habitats larvares, estudos de comportamento de repouso e alimentação, estimativas de densidade, longevidade, taxas de infeção e suscetibilidade aos inseticidas;

- **Observações regulares ou de tendência:** Trata-se de observações de rotina ou de longo-prazo (inquéritos longitudinais ou operacionais de monitorização). São efetuadas regularmente (p. ex. semanal, mensal) a fim de avaliar o impacto das medidas de controlo;
- **Verificações locais:** Estas são realizadas em localidades escolhidas aleatoriamente, diferentes das estações de vigilância fixas, para fornecer informações complementares em áreas que, de outra forma, não estariam representadas na monitorização de rotina;
- **Investigações focais:** São realizadas em novas áreas de transmissão de malária ou áreas com transmissão persistente, para investigar as razões da transmissão, ou porque é que as intervenções implementadas estão a ser ineficazes na redução da incidência da doença.

Unidade 2
Biologia de Vetores de Malária

Objetivos de aprendizagem

O conhecimento sobre a biologia e comportamento de mosquitos *Anopheles* é importante para entender como a malária é transmitida e para ajudar na elaboração de estratégias de controlo adequadas. Esta unidade tem como objetivo fornecer conhecimentos básicos sobre:

- **A doença e o parasita;**
- **O ciclo de vida do mosquito *Anopheles*;**
- **Os habitats larvares e as condições que afetam o número de adultos emergidos;**
- **Características, com importância médica, dos mosquitos adultos.**

2.1 Malária

A malária é um dos principais problemas de saúde pública na maioria dos países tropicais. Esta doença é causada por parasitas do género *Plasmodium*, que são transmitidos de uma pessoa para outra através da picada de um mosquito *Anopheles* fêmea. Os machos *Anopheles* alimentam-se apenas de néctares e sucos vegetais e, portanto, não transmitem malária.

Existem cinco espécies de *Plasmodium* que infetam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Esta última ocorre no Sudeste Asiático e infeta principalmente primatas não-humanos.

Existem cerca de 480 espécies de mosquitos *Anopheles*, das quais apenas cerca de 80 transmitem a malária. Destas, 15 são consideradas importantes vetores de malária. O mosquito contrai o parasita *Plasmodium* quando se alimenta do sangue de uma pessoa infetada. Uma vez dentro do mosquito, o parasita multiplica-se e desloca-se desde o estômago até às glândulas salivares. Quando atinge as glândulas salivares, o parasita é transmitido a outra pessoa, da próxima vez que o mosquito realize uma refeição sanguínea.

2.2 Ciclo de vida do mosquito *Anopheles*

Durante o seu ciclo de vida, o mosquito passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 1). Na passagem de larva a pupa e de pupa a adulto, o mosquito sofre grandes mudanças, designadas por metamorfoses.

Fase de ovo

- As fêmeas adultas de *Anopheles* acasalam apenas uma única vez. Esta única inseminação permite-lhes colocarem ovos durante o todo o seu tempo de vida.
- As fêmeas precisam de realizar uma refeição sanguínea a cada 2-3 dias. O sangue é necessário para o desenvolvimento dos ovos. As fêmeas fazem uma postura de ovos antes de realizarem a próxima refeição sanguínea.
- Os ovos são colocados no meio aquático (p. ex. poças, charcos, ribeiras, lagos) em grupos (posturas) de 50-200 ovos.
- O período de tempo necessário para os ovos eclodirem em larvas depende muito da temperatura:
  - A cerca de 30°C, os ovos eclodem em 2-3 dias.
  - Em zonas temperadas (16°C), cerca de 7-14 dias.

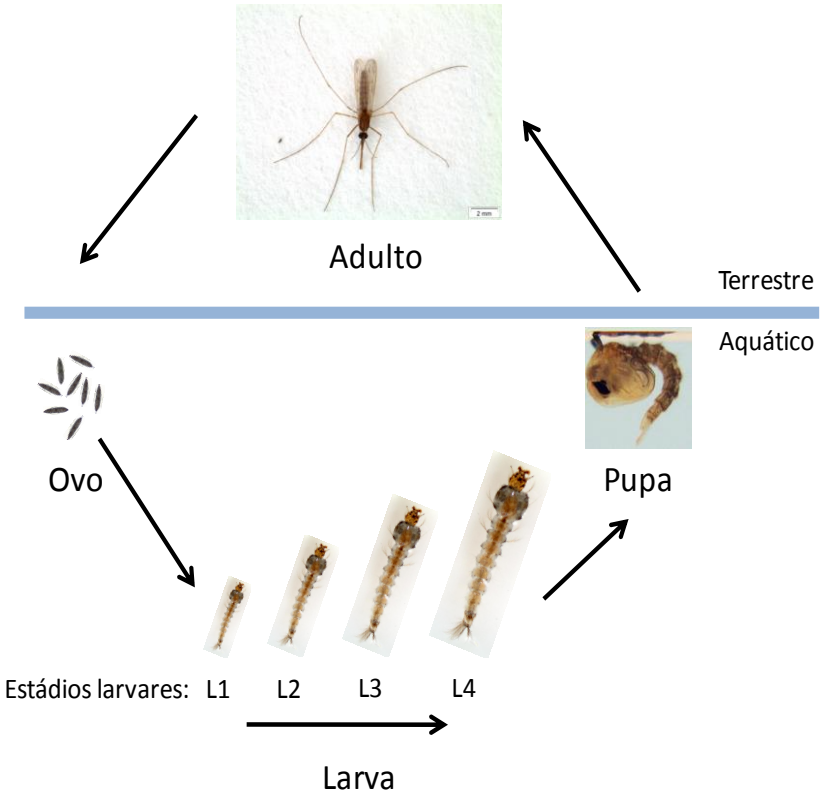


Figura 1. Fases do ciclo de vida do mosquito *Anopheles*

Fase de larva

- A larva tem uma cabeça bem desenvolvida, apresentando escovas bucais que são usadas para se alimentar (filtradores). A larva alimenta-se de micro-organismos (p. ex. algas, bactérias) e de matéria orgânica existente na água onde que se criam.
- A larva de *Anopheles* não tem sifão respiratório. Ela permanece paralela à superfície da água para respirar.
- As larvas passam por quatro estádios de desenvolvimento, designados por instares e denotados como L1, L2, L3 e L4 (Fig. 1), até se transformarem, por metamorfose, em pupa.
- A temperatura da água influencia o tempo necessário ao desenvolvimento larvar, que é mais curto em águas mais quentes. Dependendo da espécie do mosquito, o desenvolvimento da larva até à fase de pupa pode durar cerca de 5-10 dias, em condições de temperatura tropicais.

Fase de pupa

- A pupa tem a forma de uma vírgula e mantem-se à superfície da água.
- Tem um par de trompetas respiratórias através das quais respira quando está à superfície.
- A pupa não se alimenta mas é móvel e responde a estímulos.
- Esta é uma fase de repouso ou inatividade, durante a qual ocorre uma grande transformação do organismo do mosquito (metamorfose), que leva à passagem do meio aquático para o meio terrestre.
- A fase de pupa dura cerca de 2-3 dias.

Fase de adulto

- Em geral, o adulto emerge da pupa ao anoitecer.
- Depois de emergir, o mosquito adulto repousa por um curto período de tempo, a fim de endurecer seu corpo.
- Pouco tempo após a emergência, os mosquitos acasalam. Os machos formam grandes enxames, geralmente ao anoitecer, e as fêmeas voam para os enxames para acasalar (Fig. 2).
- Tanto os mosquitos machos como as fêmeas alimentam-se de néctares vegetais para obter energia.
- Após o acasalamento, as fêmeas procuram uma refeição de sangue para desenvolver os seus ovos. Para algumas espécies uma refeição sanguínea é suficiente para o desenvolvimento dos ovos. Em outras espécies, são necessárias duas alimentações, pelo menos para o desenvolvimento da primeira postura de ovos.
- O período de tempo entre o ovo e o adulto pode variar entre 7 dias, a 31°C, e 20 dias, a 20°C.

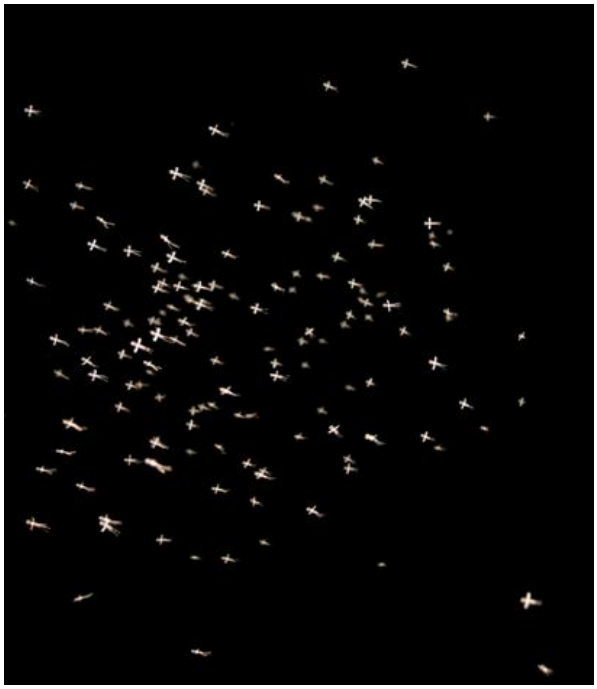


Figura 2. Machos de *Anopheles* formam enxames ao final da tarde para acasalar

(foto: JD Charlwood)

2.3 Habitats larvares e fatores que afetam a produção de adultos

O tipo de coleção de água adequado para o desenvolvimento das larvas de mosquitos (criadouro) é bastante variável entre espécies de mosquitos, e mesmo dentro da mesma espécie. Algumas espécies preferem corpos de água sombrios, enquanto outros preferem habitats expostos ao sol. Algumas espécies preferem águas não poluídas, enquanto outras reproduzem-se em água poluída. Algumas espécies exploram corpos de água de natureza mais permanente (p. ex. drenagens, tanques, canais de irrigação) e outras ocupam poças e charcos temporários (Fig. 3).

Os mosquitos *Anopheles* não costumam reproduzir-se em águas muito movimentadas, como em algumas ribeiras ou rios, já que as larvas não estão adaptadas para suportar a ondulação. Mas os criadouros larvares podem ser tão diversos como pântanos, campos de arroz, poças, charcos, sapais, valas de drenagem, canais de irrigação, buracos de árvores, recipientes de armazenamento de água e latas vazias. No entanto, algumas espécies de anofelíneos mostram preferência por habitats larvares específicos.

Em África:

- *Anopheles gambiae* prefere pequenas coleções temporárias de água, expostas à luz solar, tais como poças, pegadas de animais e marcas de pneu em estradas de terra;
- *Anopheles funestus* prefere corpos de água permanentes ou semipermanentes, geralmente com vegetação (p. ex. margens de rios e ribeiros, pântanos e brejos).

Nas Américas:

- Larvas de *Anopheles darlingi* são encontradas principalmente nas margens sombrias de ribeiros e lagoas com águas claras e fundos lodosos, vegetação emergente ou flutuante.

Na Ásia:

- Em áreas urbanas, *Anopheles stephensi* cria-se em habitats de origem humana (antropogénica), tais como cisternas, poços, sarjetas e fontes, que podem conter diversos tipos de água, incluindo água poluída e salobra.

Não se sabe muito sobre os fatores que afetam a sobrevivência das larvas e dos mecanismos que controlam a emergência dos adultos. No entanto, a pluviosidade, temperatura, humidade e a época do ano podem influenciar a sobrevivência das larvas e a emergência de adultos.

a. Pequena poça (temporário), b. Marcas de pneu numa estrada (temporário), c. Lagoa (permanente), d. Arrozal (semipermanente), e. Tanques de água e valas (permanente ou semipermanente)

Figura 3. Tipos de criadouros larvares de mosquitos

2.4 Características de importância médica nos adultos

A longevidade dos *Anopheles* adultos varia entre espécies e depende de fatores externos como humidade, a temperatura e a presença de predadores. O tempo de vida médio de um *Anopheles* fêmea é cerca de 15 dias, mas tempos de vida até vários meses têm sido observados em algumas espécies.

Os comportamentos associados à alimentação com sangue (comportamento de picada) e ao repouso após a refeição sanguínea para o desenvolvimento dos ovos são de grande importância epidemiológica.

- Algumas espécies picam predominantemente dentro de habitações humanas (endofágicas), enquanto outras picam fora das casas (exofágicas).
- Algumas espécies preferem picar humanos (antropofílicas), enquanto outras se alimentam preferencialmente em outros animais (zoofílicas).
- Algumas espécies tendem a repousar no interior das habitações humanas durante a digestão do sangue e desenvolvimento dos ovos (endofílicas), enquanto outras repousam fora das casas (exofílicas).

As espécies de mosquitos podem também diferir na sua atividade de picada durante a noite. Algumas espécies atingem o pico picada nas primeiras horas da noite, enquanto outras atingem o pico ao amanhecer. Algumas espécies começam a picar ao entardecer, antes mesmo de o anoitecer. O padrão diário de picadas de uma espécie de mosquito é designado por ciclo de picada.

Unidade 3
Anatomia e Identificação de Mosquitos

Objetivos de aprendizagem

No final desta unidade, o aluno deve ser capaz de:

- **Saber como identificar mosquitos *Anopheles* adultos;**
- **Diferenciar entre mosquitos machos e fêmeas;**
- **Distinguir a fêmea de *Anopheles* de outros mosquitos fêmea;**
- **Distinguir os ovos e larvas de *Anopheles* dos de outros mosquitos.**

A malária humana é transmitida exclusivamente por mosquitos do género *Anopheles*. Este género pertence a uma subfamília chamada Anophelinae (anofelíneos) dentro da família Culicidae. Há uma outra subfamília chamada Culicinae (culicíneos), que inclui dois géneros de grande importância médica: *Aedes* (p. ex. *Aedes aegypti*, o vetor da dengue e da febre amarela) e *Culex* (p. ex. *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose linfática). Com a exceção da pupa, é possível distinguir facilmente anofelíneos (subfamília Anophelinae) de culicíneos (subfamília Culicinae) em todas as fases do ciclo de vida do mosquito.

3.1 Como distinguir os ovos de anofelíneos de outros culicíneos

- Os ovos de *Anopheles* têm flutuadores nas faces laterais (Fig. 4) e são colocados separadamente na água.
- Os ovos de culicíneos não têm flutuadores. Os ovos de espécies do género *Culex* são colocados em aglomerado, fazendo lembrar uma jangada que flutua na superfície da água. Os ovos de *Aedes* são colocados individualmente, mas não têm flutuadores e, frequentemente, são depositados em superfícies sólidas junto à linha de água e não sobre a água (Fig. 4).

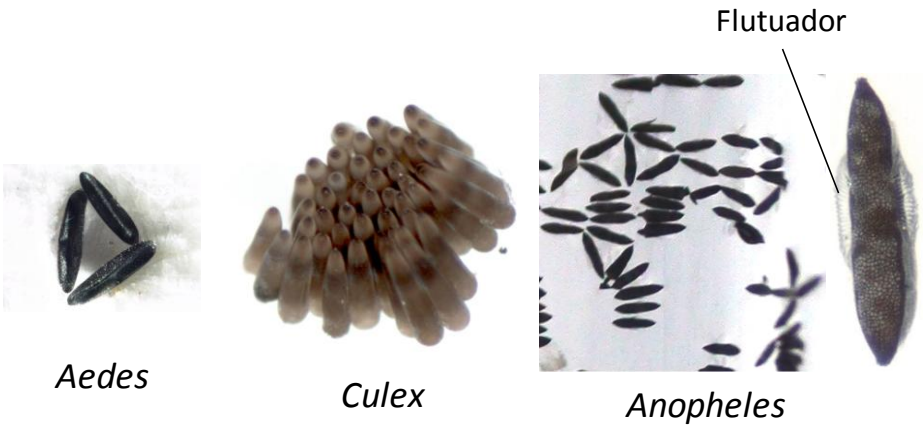


Figura 4. Exemplos de ovos de *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*

3.2 Como distinguir entre larvas de anofelíneos e culicíneos

A larva do mosquito é dividida em cabeça, tórax e do abdómen (Fig. 5).

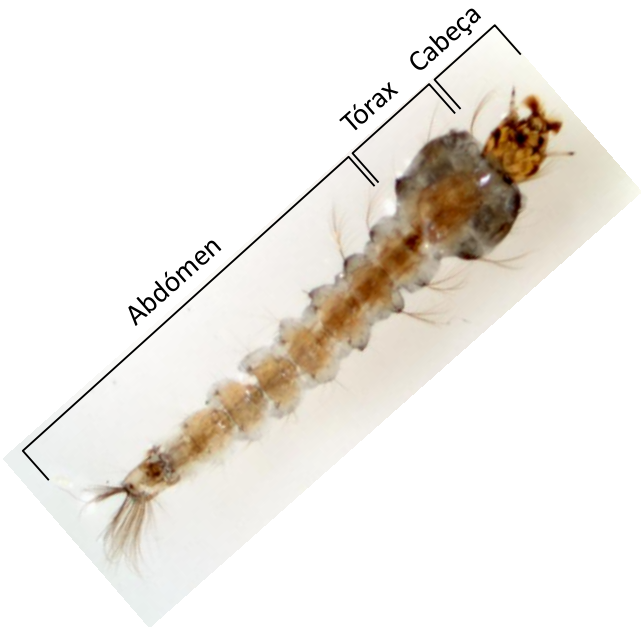


Figura 5. Morfologia de uma larva de *Anopheles*

Duas características principais diferenciam as larvas de anofelíneos das de culicíneos (Fig. 6):

- As larvas de culicíneos (*Culex* e *Aedes*) têm um tubo (sifão) para respirar, apresentando uma posição obliqua quando estão junto à superfície da água;
- As larvas de anofelíneos não possuem um sifão e repousam paralelamente à superfície da água. Em vez de um sifão, elas respiram através de pequenas aberturas chamadas espiráculos.

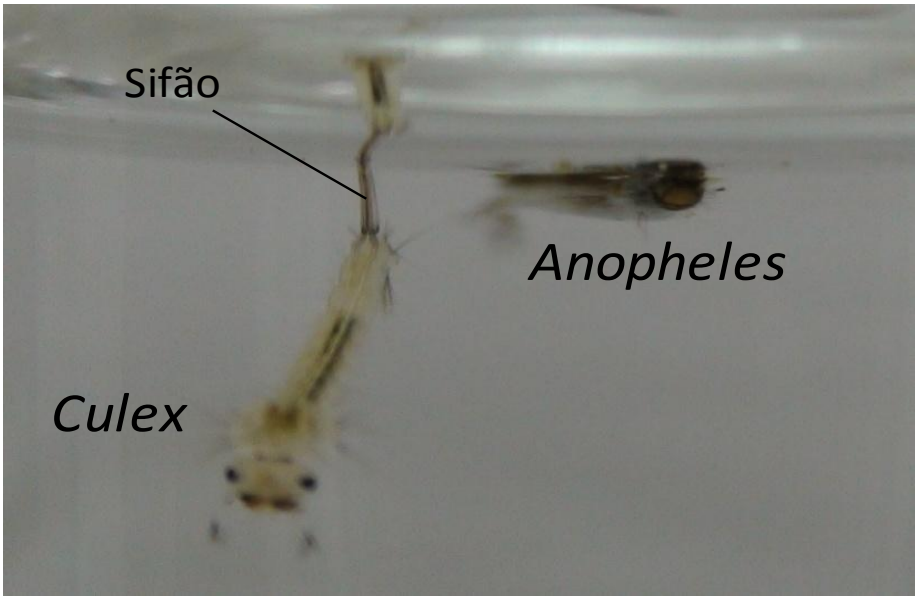


Figura 6. Diferenças entre larvas de anofelíneos e culicíneos

3.3 A pupa

A pupa de um mosquito tem a forma de uma vírgula (Fig. 7), estando o seu corpo dividido em cefalotórax e abdómen. As pupas repousam à superfície da água, mas nadam rapidamente para o fundo quando perturbadas. É muito difícil distinguir entre pupas de anofelíneos e culicíneos, dado que as diferenças morfológicas nesta fase são muito subtis.

Figura 7. Pupa de *Anopheles*

3.4 Como distinguir entre anofelíneos e culicíneos adultos

O corpo do mosquito adulto, tal como o das larvas, é dividido em cabeça, tórax e abdómen (Fig. 8). As principais estruturas da cabeça incluem dois grandes olhos compostos, duas antenas, dois palpos maxilares e a probóscide, que é adaptada para picar e sugar. No tórax, há três pares de patas (anteriores, médias e posteriores), um par de asas e um par de balanceiros (asas vestigiais modificadas). O abdómen é composto por 10 segmentos, estando os dois últimos modificados para formar a genitália (masculina ou feminina).

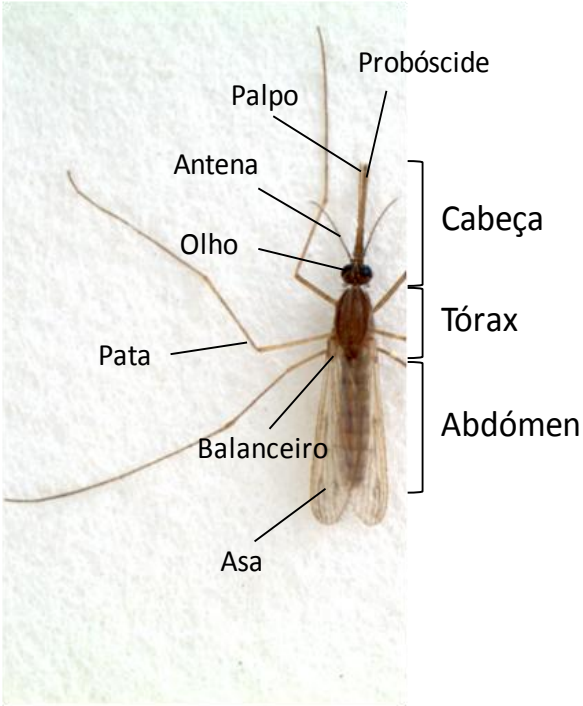


Figura 8. Anatomia de um mosquito adulto

Existem duas características principais que podem ser usadas para distinguir entre anofelíneos e culicíneos adultos: os palpos maxilares (Fig. 9) e a posição de repouso (Fig. 10).

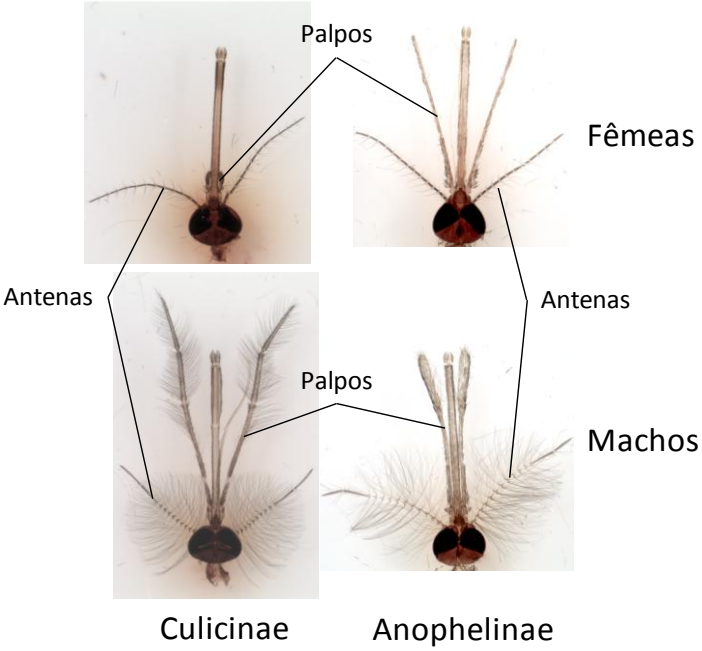


Figura 9. Diferenças na cabeça do macho e da fêmea de anofelíneos e culicíneos

- As fêmeas de anofelíneos apresentam palpos maxilares tão longos quanto a probóscide. As fêmeas de culicíneos têm palpos muito mais curtos do que a probóscide.
- A terminação dos palpos dos anofelíneos macho apresenta a extremidade dilatada, de uma forma que lembra um machado ou um taco de golfe. O mesmo não acontece nos culicíneos macho.
- Comum aos anofelíneos e culicíneos é o dimorfismo sexual das antenas. Os machos têm antenas com muitas sedas grandes (chamadas de plumosas) enquanto as fêmeas têm antenas com poucas sedas finas (chamadas de pilosas) (Fig. 9).
- Os mosquitos anofelíneos adultos tendem a repousar numa posição oblíqua, num ângulo entre 50° e 90° relativo à superfície. Os culicíneos tendem a repousar paralelamente à superfície de repouso (Fig. 10).

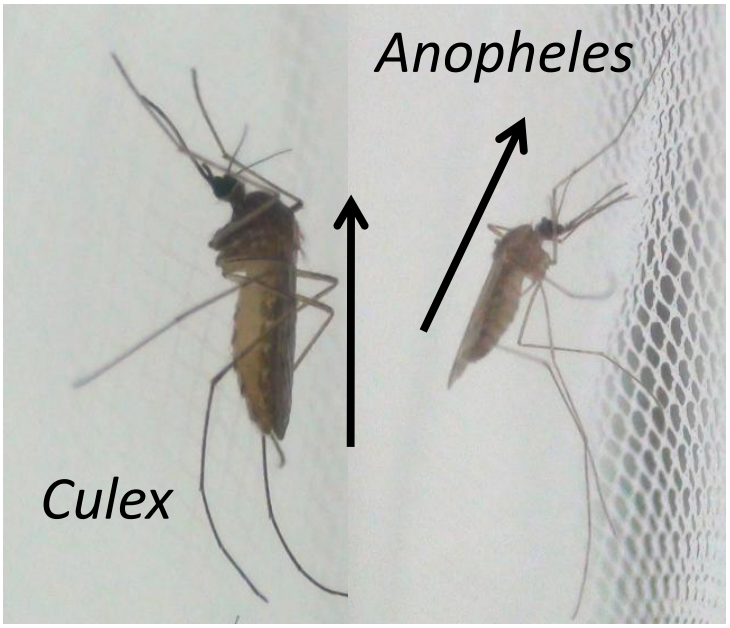


Figura 10. Posição de repouso de mosquitos anofelíneos e culicíneos adultos

3.5 Métodos de identificação de espécies de mosquitos

Para além das diferenças entre anofelíneos e culicíneos acima mencionadas, é também importante fazer a distinção entre as diferentes espécies de anofelíneos. Existem vários métodos que podem ser aplicados na identificação de espécies de anofelíneos. Estes incluem:

- **Métodos morfológicos** com uso de chaves taxonómicas. Algumas das principais características morfológicas utilizadas na identificação de mosquitos estão localizadas nos palpos, probóscide, patas, asas e tórax. Existem chaves taxonómicas para a identificação de espécies de vetores de malária locais e estas chaves podem variar de acordo com a área geográfica e as espécies presentes;

- **Citotaxonomia.** Estes métodos utilizam diferenças nos cromossomas que são específicas de cada espécie. Estas técnicas podem ser aplicadas somente em certas fases do ciclo de vida do mosquito, ou em determinado sexo, em que estão presentes cromossomas politénicos ou "gigantes", adequados para observação ao microscópio;
- **Métodos moleculares.** Estes métodos consistem na análise de diferenças específicas de cada espécie ao nível do ADN. Uma vez que o ADN permanece inalterado durante o ciclo de vida do mosquito, estes métodos podem ser aplicados em qualquer fase ou estádio (imaturos e adultos) do mosquito.

Os métodos citotaxonómicos e moleculares são normalmente aplicados para identificar grupos de espécies que não apresentam diferenças morfológicas entre si, tais como as que compõem um complexo de espécies gémeas (ver Unidade 4). Estes métodos não serão demonstrados neste curso.

Unidade 4
Diversidade de Vetores de Malária

Objetivos de aprendizagem

O conhecimento dos vetores de malária locais é importante para a compreensão da transmissão e para o desenvolvimento de estratégias de controlo eficazes. Esta unidade vai ajudar a entender:

- **Que a transmissão de malária é, em muitos casos, sustentada por várias espécies de vetores que coexistem na mesma área ou região;**
- **Que diferentes espécies apresentam comportamentos diferentes, o que pode afetar a transmissão da malária e o controlo de vetores.**

Os anofelíneos compreendem cerca de 480 espécies, das quais apenas cerca de 80 são consideradas vetores da malária. Com exceção da Antártida, existem vetores da malária em todos os continentes do mundo. De grande relevância é o fato de poderem ocorrer várias espécies de vetores na mesma área e ao mesmo tempo (espécies simpátricas).

Devido às diferenças na ecologia e comportamento, espécies simpátricas podem formar sistemas vetoriais complexos. Por exemplo, quando uma espécie vetora que explora criadouros larvares semipermanentes coocorre na mesma área com uma espécie que prefere criadouros temporários, tal pode representar dificuldades acrescidas para no controlo de vetores baseado no manejo criadouros larvares. De igual modo, a ocorrência simpátrica de uma espécie vetora endofágica com uma exofágica cria desafios adicionais para a eficácia de métodos de controlo aplicados no interior das habitações, tais como LLINs.

A correta identificação dos vetores-alvo é, assim, fundamental para o sucesso da implementação de qualquer estratégia de controlo de vetores.

4.1 Complexos de espécies gémeas

Os anofelíneos compreendem várias espécies que são morfologicamente idênticas entre si, mas que têm composição genética diferente. Estas espécies são chamadas espécies gémeas ou crípticas e, juntas, são referidas como um "complexo" ou "grupo" de espécies. Apesar de serem morfologicamente idênticas, as espécies gémeas são reprodutivamente isoladas entre si. Isto resulta na acumulação de diferenças genéticas que frequentemente conduzem a diferenças na bioecologia e no comportamento. Estas diferenças podem por sua vez resultar em diferenças na importância médica entre as espécies de um complexo, o que pode ter também implicações para o controlo de vetores.

Dependendo da região geográfica, a composição das espécies de anofelíneos varia e, como tal, os vetores responsáveis pela transmissão da malária também podem variar de uma região para outra. Nas seções seguintes, será dada uma breve descrição de alguns dos principais vetores da malária humana em África, nas Américas e na Ásia. As descrições das espécies foram baseadas nas obras de Service & Townson (2002), Manguin *et al.* (2008), Hay *et al.* (2010) e Sinka *et al.* (2010a,b). Os alunos são encorajados a consultar estas obras para obter uma informação mais completa e detalhada da diversidade de espécies de vetores de malária nas diferentes regiões geográficas do mundo.

4.2 Vetores de malária nas Américas

De entre os principais mosquitos vetores responsáveis pela transmissão da malária nas Américas, destacam-se as seguintes espécies:

Anopheles albimanus

Esta espécie é um importante vetor da malária no México, América Central e na parte noroeste da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela). Os criadouros típicos desta espécie são locais expostos ao sol, com água-doce ou salobra e límpida, naturais ou antropogénicos, e geralmente contendo vegetação flutuante ou emergente. Esta espécie pica tanto no interior como no exterior das habitações humanas e é principalmente exofílica. Apresenta também uma tendência para a zoofilia, mas isto depende bastante da localização geográfica e disponibilidade de hospedeiro.

Complexo Anopheles albitarsis

O complexo *Anopheles albitarsis* compreende quatro espécies: *Anopheles albitarsis* A e B, *Anopheles marajoara* e *Anopheles deaneorum*. As larvas desenvolvem-se em criadouros de grandes dimensões expostos ao sol, como lagoas, arrozais e pântanos de água-doce, límpida, e com algas filamentosas. Os adultos são exofílicos e picam tanto humanos como animais domésticos, quer no interior quer no exterior das habitações. Este complexo pode ser encontrado em quase todo o norte, leste e região central da América do Sul.

Anopheles darlingi

Embora esteja geograficamente bastante dispersa, esta espécie é o principal vetor da malária na região amazônica. A sua distribuição estende-se desde o norte do continente (Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela e norte do Peru) até ao leste e sul do Brasil, Paraguai e norte da Argentina. É um mosquito fluvial (ribeirinho) adaptado a áreas rurais e florestais. Os criadouros característicos são as margens sombreadas de ribeiros lentos com água limpa e vegetação submersa. Pode também ser encontrado em charcos de água-doce, pântanos, lagoas e campos de arroz. *Anopheles darlingi* tende a repousar fora das habitações e o seu grau de endofagia e de antropofilia é bastante variável. Em algumas situações, esta variação tem sido associada a alterações comportamentais da população humana.

Complexo Anopheles nuneztovari

Este complexo inclui duas ou, possivelmente, três espécies gémeas (A e B/C) identificadas a partir de diferenças nos cromossomas, mas a taxonomia deste complexo ainda está para ser totalmente esclarecida. O complexo está distribuído pelo norte e centro da América do Sul, estando ausente das regiões costeiras a leste e oeste do continente. Os criadouros larvares são normalmente poças de água turva, expostas ao sol, marcas de pneus de veículos, pegadas e pequenos charcos de natureza temporária ou semipermanente. Os adultos são principalmente exofílicos, exofágicos e zoofílicos, mas podem picar humanos no exterior. Há uma diferença no ciclo de picada entre as espécies gémeas, com a espécie A a picar nas primeiras horas da noite (18.00-20:00) e as espécies B/C a picar mais tardiamente (22:00-02:00).

Complexo Anopheles pseudopunctipennis

O complexo é composto por pelo menos duas espécies gémeas e tem uma distribuição generalizada, desde o sul dos EUA, na América Central, e parte oriental do continente Sul-Americano até o norte da Argentina. Estes mosquitos podem sobreviver em altitudes elevadas (até 3000 metros). As larvas são encontradas principalmente nas margens expostas de riachos de água-doce e poças rasas junto de rios e ribeiros, onde se encontram algas filamentosas abundantes que oferecem proteção. Esta espécie pode ser um vetor importante durante a estação seca, quando o nível dos rios baixa e formam-se pequenos charcos e poças. Os adultos exibem um comportamento de picada marcadamente oportunista, alimentando-se tanto em seres humanos como em outros animais, no interior e no exterior das habitações. São considerados exofílicos mas vários estudos sugerem que uma proporção de mosquitos desta espécie repousa no interior após a alimentação sanguínea.

4.3 Vetores de malária em África

Em África, os principais vetores da malária são membros do complexo *Anopheles gambiae* e do grupo *Anopheles funestus*. Dada a grande importância da malária no continente Africano, estas são provavelmente as espécies de mosquito mais estudadas no mundo.

Complexo Anopheles gambiae

Este complexo apresenta sete espécies gémeas, que podem ser agrupadas em espécies de água-doce: *Anopheles gambiae* sensu stricto, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles bwambae* e *Anopheles quadriannulatus* A e B; e espécies de água salobra: *Anopheles melas* e *Anopheles merus*.

- ***Anopheles gambiae* s.s. e *Anopheles arabiensis***

  Anopheles gambiae s.s. e *Anopheles arabiensis* são os principais vetores da malária do complexo e apresentam uma ampla distribuição geográfica a sul do deserto do Saara. *Anopheles gambiae* s.s. predomina em zonas de floresta e savana húmida enquanto *An. arabiensis* é melhor sucedido em ambientes mais áridos. Ambas as espécies exploram criadouros temporários, geralmente poças pequenas, rasas, expostas ao sol e sem

vegetação. As duas espécies ocupam muitas vezes o mesmo criadouro. *Anopheles gambiae* s.s. alimenta-se principalmente em seres humanos (antropofílico), enquanto *An. arabiensis* é geralmente mais zoofílico. No entanto, estas espécies podem apresentar uma variação considerável na preferência alimentar ao longo do continente Africano. Com poucas exceções, *Anopheles gambiae* s.s. é geralmente endofágico e endofílico. *Anopheles arabiensis* mostra uma maior variação nestes comportamentos.

- ***Anopheles quadriannulatus* A e B**

  Anopheles quadriannulatus A é estritamente zoofílico e, assim, é o único membro do complexo *An. gambiae* que não transmite malária. Os locais de oviposição são semelhantes aos das outras espécies de água-doce do complexo. Em 1998, uma nova espécie foi descrita a partir de amostras coletadas na Etiópia e provisoriamente denominada *Anopheles quadriannulatus* espécie B. Sabe-se ainda muito pouco sobre a sua biologia.

- ***Anopheles bwambae***

  Esta espécie reproduz-se em criadouros derivados de nascentes de águas termais, com temperaturas de 33-36°C e pH ligeiramente superior ao de criadouros típicos de *An. gambiae* s.s. A distribuição desta espécie limita-se à floresta Semliki do Uganda. Apresenta elevadas densidades na floresta durante todo o ano, onde pica o homem, principalmente no exterior. Embora seja capaz de transmitir a malária, esta espécie não é considerada um vetor muito importante devido à sua distribuição limitada.

- ***Anopheles melas* e *Anopheles merus***

  Estas são as duas espécies do complexo que estão adaptadas a criadouros de água salobra. Ambas ocupam habitats costeiros com zonas de mangais (p. ex. estuários, lagoas e pântanos). No entanto, diferem na distribuição geográfica. *Anopheles melas* ocorre na costa da África Ocidental e *An. merus* está restrito à África Oriental. Ambas as espécies são consideradas vetores secundários da malária.

Grupo Anopheles funestus

O grupo *Anopheles funestus* é composto por nove espécies gémeas ou muito próximas entre si. Destas, apenas a espécies nominal, *Anopheles funestus* sensu stricto é vetor da malária em África. Nenhum dos restantes membros do grupo são vetores da malária: *Anopheles rivulorum* (África Ocidental e Oriental), *Anopheles leesoni* (África Ocidental e Oriental), *Anopheles confusus* (África Oriental), *Anopheles parensis* (África Oriental), *Anopheles vaneedeni* (norte da África do Sul), *Anopheles fuscivenosus* (Zimbabué), *Anopheles aruni* (Zanzibar) e *Anopheles brucei* (Nigéria). Estas espécies são principalmente zoofílicas.

- ***Anopheles funestus* s.s.**

  É considerado, juntamente com *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis*, um dos mais importantes vetores da malária em África. Tem uma ampla distribuição em todo o continente Africano a sul do deserto do Saara. Em geral, *Anopheles funestus* s.s. desenvolve-se em corpos de água relativamente grandes, permanentes e semipermanentes, com vegetação (p. ex. pântanos, lagoas, margens de lagos). É uma espécie altamente antropofílica que pica principalmente dentro de casa (endofágica).

4.4 Vetores de malária na Ásia

As seguintes espécies/complexos são alguns dos principais vetores de malária na região Asiática:

Complexo Anopheles culicifacies

O complexo *An. culicifacies* tem uma distribuição generalizada por todo o continente Asiático, desde a Etiópia (África) e da costa sul da Península Arábica, através do subcontinente Indiano e até ao sul da China, Vietname, Laos, Camboja, Tailândia e Myanmar. Cinco espécies gémeas, reconhecidas pelos cromossomas (A, B, C, D e E), foram descritas neste complexo. Destas, a espécie E é considerada o vetor de malária mais importante do complexo, em particular na Índia. A espécie B não é vetor. As larvas ocupam uma variedade de criadouros, de água limpa ou poluída, expostos ao sol ou à sombra. A espécie E é altamente endofílica e antropofílica, enquanto as outras espécies são mais zoofílicas, especialmente a espécie B. As picadas ocorrem tanto no interior como no exterior das habitações humanas.

Complexo Anopheles dirus

Este complexo inclui sete espécies gémeas: Anopheles dirus, Anopheles cracens, Anopheles scanloni, Anopheles baimaii, Anopheles elegans, Anopheles nemophilous e Anopheles takasagoensis. Com a exceção de An. elegans (que é encontrada nas florestas montanhosas do sudoeste da Índia), An. baimaii (do nordeste da Índia até o sul de Myanmar e oeste da Tailândia) e An. takasagoensis (Taiwan), as restantes espécies deste complexo são distribuídos em toda a Indochina e península Malaia. As larvas criam-se, normalmente, em pequenas poças temporárias e sombreadas e em pegadas animais, no interior ou nas margens das florestas. O complexo inclui vetores principais de malária em áreas de floresta tropical, floresta cultivada e margens de florestais; mas também espécies com pouca ou nenhuma importância na transmissão da malária. Anopheles dirus e An. baimaii são vetores principais de malária em zonas de floresta, sendo principalmente exofágicos e antropofílicos. Tendem a repousar no exterior após a refeição sanguínea. Anopheles nemophilous e An. takasagoensis são espécies zoofílicas e são, assim, consideradas como não-vetores.

Grupo Anopheles maculatus

O grupo An. maculatus inclui oito espécies, das quais seis formam dois subgrupos: subgrupo maculatus (Anopheles dispar, Anopheles greeni, Anopheles dravidicus e Anopheles maculatus); subgrupo sawadwongporni (Anopheles notanandai e Anopheles sawadwongporni). Existem ainda duas espécies que não estão atribuídas a nenhum subgrupo: Anopheles pseudowillmori e Anopheles willmori. Os membros do grupo An. maculatus grupo estão distribuídos em toda a Ásia, da Índia à Indonésia e Filipinas. A definição precisa do papel relativo de cada espécie na transmissão da malária tem sido difícil, devido a problemas de identificação.

- ***Anopheles maculatus***

  A espécie nominal do grupo tem a distribuição mais ampla, que vai desde o oeste do Afeganistão e Paquistão, sul da China, Taiwan, Indochina, penínsulas Malaia, até às ilhas Indonésias (Sumatra e Java). É considerado um importante vetor de malária no leste da Índia, sul da Tailândia, Malásia e Java. Esta espécie é encontrada principalmente em ou perto de áreas montanhosas, onde explora uma variedade de criadouros larvares, incluindo águas de infiltração, valas, arrozais, lagoas, margens de ribeiros, pântanos e lagos. Os adultos picam seres humanos e outros animais, tanto dentro como fora de casa, e repousam no exterior após a alimentação.

Complexo Anopheles minimus

Este complexo é formado por pelo menos três espécies gémeas: *Anopheles minimus* espécie A, *Anopheles harrisoni* (espécie C) e *Anopheles minimus* espécie E. A distribuição do complexo estende-se desde o nordeste da Índia, Bangladeche, Vietname, Laos, Camboja, Tailândia, Myanmar, sul da China, até à Malásia e ilhas da Indonésia. *Anopheles minimus* e *An. harrisoni* são responsáveis pela transmissão da malária em regiões montanhosas, a altitudes entre 200 e 1000 metros. Ocorrem em áreas florestais, onde a larvas se desenvolvem nas margens verdejantes de ribeiros com águas correntes lentas e límpidas, mas também podem explorar reservatórios de água, arrozais e escavações. *Anopheles minimus* é considerado antropofílico, endofágico e endofílico, mas apresenta variações no comportamento de picada. Em comparação, *An. harrisoni* parece ser mais zoofílico e exofágico.

Unidade 5
Colheita de Mosquitos (Larvas)

Objetivos de aprendizagem

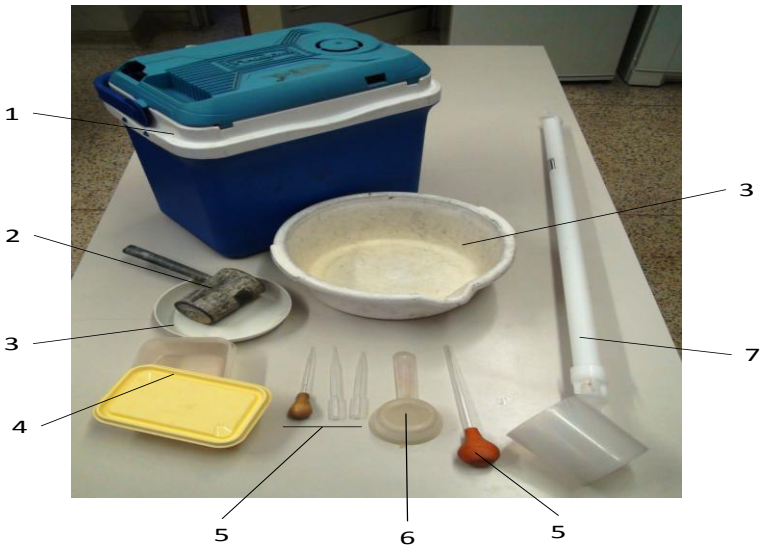
Esta unidade irá transmitir conhecimentos básicos sobre como:

- **Realizar colheitas de larvas e pupas de mosquitos vetores em habitats naturais.**

As várias espécies de mosquitos vetores podem exibir diferentes preferências de habitat larvar. Os criadouros larvares podem ser muito diversos, incluindo lagoas, lagos, charcos, pântanos, arrozais, pequenas poças de água das chuvas, pegadas de animais, marcas de pneus, buracos de árvores, axilas de plantas e margens de ribeiros. É importante conhecer as preferências de criadouros dos vetores locais de malária, com vista a implementar medidas de controlo eficazes. A colheita de larvas de mosquitos é uma atividade fundamental na vigilância de vetores. As colheitas de larvas servem para:

- Determinar as espécies de vetores presentes na área de estudo;
- Identificar os criadouros preferenciais de cada espécie;
- Determinar a distribuição geográfica dos vetores;
- Avaliar o impacto de medidas antilarvares na densidade larvar;
- Obter amostras de larvas para se criar adultos no insectário.

Os equipamentos e materiais para colheita de larvas dependem do método a ser utilizado. Os equipamentos e materiais mais comuns incluem (Fig. 11): caços, redes (para maior concentração de larvas), quadrantes, tabuleiros (pratos, bacias), coadores, conchas para pequenas coleções de água, pipetas, caixas com tampa (para guardar as amostras) e materiais de registo (marcadores à prova de água, fita adesiva, fichas de campo; ver secção 5.2). Um GPS (sistema de posicionamento global), termómetro de água e medidor de pH também são úteis para caracterizar os criadouros. Os coletores devem usar botas de borracha e usar luvas de proteção quando efetuam colheitas.



1. Caixa térmica, 2. Concha, 3. Prato e bacia, 4. Caixa com tampa, 5. Pipetas, 6. Coador, 7. Caço.

Figura 11. Principais materiais e equipamentos necessários para a colheita de larvas

5.1 Métodos de colheita

Existem vários métodos de amostragem de larvas. A aplicação de cada método depende da natureza e tipo de criadouro, tal como descrito nos seguintes parágrafos.

O coletor deve aproximar-se do criadouro com cuidado, evitando qualquer perturbação que fará com que as larvas e pupas nadem para o fundo do criadouro. É importante que o coletor não faça sombra sobre a água, o que também perturba as larvas. Se larvas e pupas se movimentarem, pode ser necessário permanecer quieto junto ao criadouro durante alguns minutos, até que os imaturos voltem à superfície.

Colheita com caço

- Este método é normalmente utilizado para a amostragem de corpos de água relativamente grandes, como pântanos, valas, charcos margens rios ou ribeiros e arrozais (Fig. 12).
- O caço deve ser suavemente introduzido na água, num ângulo de cerca de 45°, minimizando a perturbação. De seguida, arrasta-se o caço à superfície da água ou afunda-se o caço de modo a que a água entre lentamente, fazendo com que as larvas entrem no caço. Deve ter-se cuidado para não derramar água do caço quando este é retirado do criadouro.
- As larvas devem ser colhidas do caço com uma pipeta e transferidas para um frasco ou caixa devidamente etiquetados.

- Quando o criadouro tem vegetação emergente, o coletor deve perturbar a água, levando as larvas a nadar para o fundo e, em seguida, retirar um pouco da vegetação. Aguarda-se então alguns minutos antes de retomar a amostragem, como descrito anteriormente.
- O número de amostras de água do criadouro, retiradas com o caço (caçadas ou conchadas), deve ser anotado para o cálculo da densidade larvar. Também se deve anotar o tempo gasto na colheita em cada criadouro.

Figura 12. Colheita de larvas com caço

Colheita com rede

- Este método consiste na utilização de uma rede de malha fina montada num cabo, e com uma garrafa de plástico ou tubo ligado à extremidade da rede. As redes são normalmente usadas para colher larvas e pupas em corpos de água de grandes dimensões, como lagoas e pequenos lagos.
- A rede deve ser posicionada num ângulo de cerca de 45° relativo à superfície da água e arrastada à superfície. As larvas e pupas são capturadas na garrafa de plástico ou tubo colocados na extremidade da rede.

Colheita com pipeta

- Este método é utilizado na colheita de larvas em criadouros pequenos, tais como pequenas poças, pegadas de animais, pequenos contentores, axilas de plantas e buracos de árvores (Fig. 13).

Figura 13. Colheita de larvas com pipeta

5.2 Registos de colheita

Sempre que possível, utilize um GPS ou outros meios manuais (p. ex. mapa desenhado) para localizar e numerar os criadouros amostrados. As características de cada criadouro devem ser anotadas, nomeadamente:

- Localização geográfica (coordenadas GPS, nome da localidade);
- Tipo de criadouro (permanente, semipermanente, temporário);
- Origem da água (p. ex. chuva, rio, lagoa, antropogénica);
- Natureza da coleção de água (p. ex. poça, arrozal, vala);
- A exposição à luz solar (ensolarada sombreada);
- Presença de vegetação (emergente, submersa, flutuante);
- Características da água (p. ex. clara, turva, poluída, escura, temperatura, pH).

Os registos também devem incluir o número de amostras de água retiradas de cada criadouro e o período de tempo de cada amostragem. Todos os frascos/caixas contendo larvas de um criadouro devem ser identificados com o número do criadouro que foi anotado no caderno ou ficha de registo (ficha de campo). Um exemplo de uma ficha de campo para colheitas larvares pode ser encontrado no Anexo II.

5.3 Transporte de larvas vivas

Todas as larvas colhidas de um criadouro devem ser mantidas num frasco ou caixa, marcado com uma etiqueta escrita a lápis. A etiqueta é colocada no interior do recipiente. O rótulo deve incluir informações importantes, como a data, local, iniciais do coletor e número da amostra/criadouro. Esta informação deve ser replicada na ficha de registo. Além disso, a parte lateral do recipiente pode também ser rotulada com um marcador de tinta permanente.

- Para evitar a agitação excessiva ou exposição ao calor extremo, os recipientes contendo as larvas (frascos/caixas) devem ser transportados numa caixa térmica com placas de frio.
- Ao transportar as larvas por distâncias longas, não se deve cobrir os recipientes. Se cobertos, deve-se abrir os recipientes em intervalos de tempo regulares, por exemplo, a cada duas horas. Certifique-se que há cerca de 1 a 2 cm de espaço entre a água e a tampa do recipiente para permitir que haja ar para as larvas e pupas respirarem.
- Em algumas ocasiões, é aconselhável transportar água do criadouro onde as larvas foram colhidas noutro recipiente, para ser usada na criação das larvas até à fase de adulto, especialmente se estes mosquitos vão ser utilizados em ensaios de suscetibilidade aos inseticidas.

5.4 Conservação de amostras

No laboratório, as larvas são identificadas e contadas, podendo ser preservadas para análises posteriores. As larvas podem ser mortas pelo calor (colocando-as em água quente a 50-70°C) ou por afogamento em etanol (álcool) absoluto. As larvas devem ser conservadas em etanol 70-80% ou etanol a 80% + 2% de glicerina. Se é utilizada água quente, esta deve ser despejada com cuidado para que as larvas, agora mortas, permaneçam no frasco. Em seguida, adiciona-se o etanol e fecha-se o frasco.

5.5 Estimativas de parâmetros larvares

As pesquisas de criadouros larvares fornecem várias informações sobre aspetos bioecológicos das espécies de mosquitos. São também utilizadas para avaliar o impacto das medidas de controlo do vetor, através da comparação de densidades larvares e da ocupação de criadouros, antes e depois da implementação da intervenção.

A estimação da densidade larvar é um processo complexo, pois exige uma padronização do esforço de amostragem. Por exemplo, isto pode implicar colher o mesmo número de amostras de água em cada criadouro, utilizando caços do mesmo tamanho. Tal pode ser difícil no campo, dado que os criadouros podem variar muito em tamanho e forma. Para ultrapassar estas limitações, podem ser necessários equipamentos adicionais e estratégias de amostragem mais elaboradas para estimar densidades larvais. Quando as condições de amostragem correta são

cumpridas, pode-se estimar a densidade larvar através de um índice simples, o Índice de Criação de Mosquitos (BI)[3]:

$$BI = TLP \div ND \times BP$$

Onde:

TLP = número total de larvas colhidas
ND = número total de amostras de água retiradas com o caço
BP = número de criadouros prospetados

Outros parâmetros estão disponíveis para estimar a ocupação dos criadouros por mosquitos. Três exemplos são dados a seguir[4].

Índice de Criação Geral (ICG)

Este índice é uma medida da proporção de coleções de água que os mosquitos utilizam para se desenvolver, numa dada localidade. É calculado dividindo-se o número de criadouros com culicídeos imaturos (larvas e pupas) pelo número total de coleções de água prospetadas.

Índice de Criação Absoluto (IBA)

É a proporção relativa de criadouros ocupados por uma espécie de vetor, numa dada localidade. O cálculo deste índice requer que as larvas sejam identificadas ao nível da espécie. Obtém-se dividindo o número de criadouros positivos para essa espécie pelo número total de coleções de água prospetadas.

Índice de Criação Relativo (ICR)

Este parâmetro reflete a abundância de criadouros de uma determinada espécie em relação ao número de coleções de água onde são encontrados mosquitos, numa localidade. É calculado dividindo-se o número de criadouros positivos para a espécie pelo número total de criadouros positivos para mosquitos.

[3] Belkin JN (1954). Simple larval and adult mosquito indexes for routine mosquito control operations. *Mosquito News* 14:127-131.

[4] Ribeiro H *et al.* (1980). *Os mosquitos de Cabo Verde (Diptera: Culicidae). Sistemática, distribuição, bioecologia e importância médica.* Junta de Investigações Científicas do Ultramar, Lisboa, Portugal. 141pp.

Unidade 6
Colheita de Mosquitos (Adultos)

Objetivos de aprendizagem

Esta unidade proporcionará informação básica sobre:

- **Métodos utilizados para capturar mosquitos adultos.**

Em qualquer localidade, a população de mosquitos é composta por diferentes espécies, exibindo diferentes comportamentos e estados fisiológicos (p. ex. fêmeas recém-alimentadas, grávidas). O mosquito também pode apresentar diferentes comportamentos consoante o seu estado fisiológico. Isto inclui procurar um hospedeiro para se alimentar de sangue, repousar durante a maturação dos ovos e sair das casas em busca de um criadouro para pôr os ovos. Os vários métodos de amostragem de mosquitos adultos foram concebidos tendo em conta estes diferentes comportamentos.

6.1 Colheita de mosquitos adultos

Antes de sair para o campo, todo o equipamento essencial para a colheita de mosquitos adultos deve estar preparado. Haverá uma aula em que será demonstrado como preparar os materiais utilizados em cada método de colheita e como manuseá-los de maneira correta. Os alunos terão oportunidade de praticar estes procedimentos antes das aulas de campo.

Colheita sobre humanos

Este é um método padronizado que permite avaliar as interações entre o vetor e o hospedeiro humano. O número de vetores que picam os seres humanos é um parâmetro importante para estimar o nível de transmissão da malária, uma vez que ajuda a responder aos seguintes pontos:

- Quais os mosquitos anofelíneos que picam os seres humanos;
- Quais das espécies que picam são vetores de malária;
- Quantas vezes é uma pessoa picada por um vetor;
- Qual é o ciclo de picada durante a noite;
- Quais os vetores que picam dentro e fora das habitações.

Materiais essenciais (Fig. 14): aspiradores bucais ou mecânicos, copos de papel não-encerado cobertos com rede de malha fina (tule), elásticos, lanternas, baterias (pilhas), tubos de ensaio (110mm x 10mm ou 60mm x 10mm) e rolhas de borracha (como alternativa aos aspiradores e copos), algodão, solução de açúcar a 10%, lápis ou caneta de tinta permanente e fita adesiva.

1. Aspirador bucal, 2. Aspirador mecânico, 3. Lanterna, 4. Baterias (pilhas), 5. Fita adesiva, 6. Elásticos, 7. Copos de papel tapados com rede, 8. Algodão.

Figura 14. Principais materiais para colheita manual de mosquitos

As colheitas sobre humanos envolvem uma equipa de duas ou mais pessoas, sentadas no interior ou exterior das casas, que colhem os mosquitos quando estes os tentam picar (Fig. 15). Alternativamente, um par de coletores trabalham juntos, em que um expõe as pernas e outro captura os mosquitos que pousam sobre o seu parceiro.

Figura 15. Colheita sobre humanos

Estas colheitas são geralmente realizadas durante a noite, para acompanhar o ciclo de picada de mosquitos do género *Anopheles*. Sempre que possível, as equipas de coletores são colocadas dentro e fora das casas. As colheitas são feitas durante toda a noite ou parte da noite, dependendo do objetivo do estudo. As colheitas no interior das habitações costumam ser feitas entre as 18.00 e as 06.00, enquanto as coleções no exterior podem ser realizadas entre as 18:00 e as 22:00, com o pressuposto de que as pessoas vão dormir para dentro das suas casas por volta das 22 horas e, portanto, não estão em risco de serem picadas no exterior após esta hora. No entanto, em comunidades onde as pessoas tendem a dormir ao ar livre, seja por causa do tempo quente ou por outros motivos, deve-se realizar as colheitas no exterior também entre as 18.00 e 06.00.

Os coletores expõem as pernas até o joelho para servir como isca e permanecem sentados o mais silenciosamente possível. Assim que o coletor sente o mosquito a pousar, liga a lanterna para ver o mosquito e captura-o com o aspirador, colocando-o de seguida dentro do copo de papel coberto com tule. Não é necessário deixar que os mosquitos piquem ou se alimentem. Os mosquitos devem ser capturados assim que se sente que eles pousaram. Assim, trata-se mais de uma medida do número de mosquitos que pousam e não tanto dos que se alimentam.

Deve-se usar um copo de papel diferente, devidamente etiquetado, para cada hora de colheita. Isto irá permitir a contagem do número de mosquitos que foram capturados em cada hora. Os mosquitos colhidos serão então identificados de acordo com a espécie na manhã seguinte. As amostras são assim separadas por espécie, casa, dia e hora da colheita.

As limitações deste método incluem a variação na atratividade dos hospedeiros humanos para os mosquitos e considerações éticas a respeito da infeção acidental com malária. Para ultrapassar o primeiro ponto, os coletores devem trocar de local de colheita entre si, a cada hora. Deve-se administrar profilaxia antimalárica aos coletores para evitar casos de malária. Além disso, os coletores devem ter acesso imediato ao diagnóstico e tratamento com medicamentos eficazes contra a malária, no caso de algum deles contrair a doença.

Colheita com lençol e piretrina

Estas colheitas são utilizadas para estimar o número de mosquitos que repousam dentro dos quartos onde as pessoas dormiram na noite anterior. Assim, realizam-se durante a manhã. As amostras obtidas por este método permitem:

- A determinação do estado gonotrófico das fêmeas de mosquito capturadas. O estado abdominal dá indicação do comportamento de repouso e picada, com base no estado de digestão da refeição sanguínea. As fêmeas podem estar não-alimentadas, totalmente alimentadas de sangue (recém-alimentadas), semigrávidas ou grávidas, dependendo de quanto tempo elas ficaram dentro no quarto;
- A determinação de densidades sazonais de mosquitos vetores nos quartos;
- Uma medida indireta da densidade de picada em relação ao Homem, quando o vetor é altamente endofílico (repousa no interior).

Materiais essenciais: Lanternas e pilhas, placas de Petri, lençóis de algodão branco (2m x 1m, 2m x 2m, 2m x 3m), pulverizadores manuais (tipo dupla-ação), inseticida (piretrina 0,2-0,3% em querosene), pinças, algodão, papel de filtro, etiquetas e contentor para o transporte de amostras.

Antes da pulverização, deve-se remover todos os animais, cobrir todos os alimentos e retirar pequenos móveis dos quartos e salas onde se fará a colheita. Cobre-se então o chão e superfícies planas (incluindo mesas) com os lençóis brancos e fecham-se todas as janelas.

O coletor, em seguida, pulveriza cuidadosamente, no sentido dos ponteiros do relógio e em direção ao teto, até o quarto (ou sala) ficar preenchido com uma névoa fina. O coletor sai então rapidamente, fecha a porta e espera cerca de 10 minutos.

Começando a partir da entrada, os cantos do lençol são dobrados e o lençol é levado para fora da casa (Fig. 16). Todos os mosquitos caídos são colhidos com uma pinça, à luz do dia, e colocados numa placa de Petri com o interior forrado com uma camada algodão ligeiramente humedecido e coberto com papel de filtro.

Os mosquitos capturados em cada casa são guardados em placas de Petri separadas, devidamente rotuladas (p. ex. data e hora da colheita, localidade, número da casa/nome do chefe de família).

Figura 16. Colheita com lençol e piretrina

Colheita de mosquitos em repouso no exterior

Este método é utilizado para capturar mosquitos que repousam fora das habitações humanas (exofílicos), nos seus locais de repouso naturais (fig. 17). Dado que alguns mosquitos se alimentam dentro de casa mas repousam no exterior e outros alimentam-se e repousam no exterior, normalmente a análise das refeições sanguíneas de mosquitos capturados no exterior pode dar uma melhor indicação da preferência de hospedeiro e do comportamento alimentar da população vetora. Os dados de colheitas no exterior são importantes na avaliação do impacto de medidas antivetoriais e fornecem informações sobre:

- As espécies que habitualmente repousam no exterior;
- A proporção de mosquitos que repousa no exterior;
- Mudanças sazonais nos habitats de repouso no exterior;
- Mudanças no número relativo de mosquitos que repousa no exterior após a aplicação de inseticidas dentro das casas.

Materiais essenciais: Lanternas e pilhas, aspiradores mecânicos (manuais ou tipo-mochila), copos de papel não-encerados cobertos com tule (para guardar os mosquitos capturados), algodão, solução de açúcar a 10%, lápis ou marcador de tinta permanente para marcar os copos e um contentor para transporte de amostras.

a b

a. Colheitas na vegetação com um aspirador tipo-mochila, b. Num estábulo, com aspiradores mecânicos (fotos: C.A. Sousa)

Figura 17. Colheita de mosquitos em repouso no exterior

Os coletores devem procurar mosquitos em repouso ao ar livre, em locais de repouso adequados. Estes são geralmente locais sombreados e húmidos, como a vegetação circundante, buracos de árvores, buracos de caranguejo, paredes exteriores de residências (junto ao telhado), abrigos de animais domésticos (currais, estábulos). As colheitas são realizadas durante o dia, normalmente durante a manhã, mas por vezes ao início da noite, dependendo da espécie de vetor.

Colheita manual (aspiração) de mosquitos em repouso no interior

As colheitas manuais são geralmente realizadas com aspiradores bucais ou mecânicos (Fig. 18). Os mosquitos são procurados e capturados das paredes dos quartos e de outras divisões da casa, e também dos móveis, com a ajuda de lanternas. Estas colheitas fornecem informações importantes, tais como:

- As espécies e a proporção de mosquitos que repousam dentro de casa;
- A densidade de mosquitos em repouso no interior, normalmente expressa no número de mosquitos em repouso, por coletor, por hora;
- As mudanças sazonais na densidade de mosquitos em repouso no interior;
- Mudanças no número relativo de mosquitos em repouso no interior, após a aplicação de inseticidas dentro das casas.

Materiais essenciais: Lanternas e pilhas, copos de papel não-encerado e cobertos com tule, aspiradores mecânicos ou bucais (tubos de ensaios em alternativa), algodão, solução de açúcar a 10%, lápis ou marcador de tinta permanente para marcar os copos e um contentor para transporte de amostras.

As colheitas realizam-se logo pela manhã, assim que os ocupantes deixam a casa. Os mosquitos podem ser mantidos vivos por um período de 24 horas para avaliar qualquer efeito *knockdown* de uma intervenção, como por exemplo pulverizações intradomiciliares, que estiver a ser implementada na região.

Figura 18. Colheita manual de mosquitos em repouso no interior

Colheita com armadilhas de saída

Este método envolve a fixação de armadilhas nas janelas da casa, para se determinar o movimento dos mosquitos durante a noite e o seu comportamento de repouso (Fig. 19).

Figura 19. Armadilha de saída

Materiais essenciais: Lanternas e pilhas, armadilhas de saída, copos de papel não-encerado e cobertos com tule, aspiradores, pinças, algodão, papel de filtro, lápis ou marcadores e solução de açúcar a 10%.

Os mosquitos são capturados dentro das armadilhas, geralmente de manhã, e são colocados nos copos de papel para serem transportadas para o laboratório.

No laboratório, as fêmeas são observadas ao estereomicroscópio para se determinar o estado abdominal. Fêmeas jovens não-alimentadas sugerem que não foram bem-sucedidas em realizar uma refeição sanguínea naquela noite. Fêmeas recém-alimentadas de sangue sugerem que estavam a sair da casa para repousar no exterior onde desenvolverão os ovos (exofílicas). Fêmeas grávidas sugerem que estas desenvolveram os ovos dentro de casa (endofílicas) e que estavam a sair para realizar a oviposição num criadouro.

6.2 Registos de colheita

As características de cada local de colheita devem ser descritas, tendo em conta a seguinte informação:

- Localidade e localização geográfica (coordenadas GPS, nome da localidade);
- Tipo de materiais de construção da casa;
- Número de quartos e salas da casa;
- Número de pessoas que dormiram na casa na noite anterior e se usaram mosquiteiro (com ou sem inseticida);
- Tipo geral e características dos locais de repouso no exterior.

Também deve ser anotada informação sobre a data e hora das colheitas. As amostras de mosquitos devem ser etiquetadas de modo a que possam ser identificadas de acordo com a colheita a que pertencem. Um exemplo de uma ficha de campo para colheitas de mosquitos adultos é dado no Anexo II.

Existem ainda outros métodos de colheita de mosquitos adultos, que se usam em situações mais particulares. Alguns exemplos são armadilhas luminosas, armadilhas de tenda, cortinas colombianas, e redes (mosquiteiros) duplas. O aluno é incentivado a procurar nas referências mais informações sobre estes métodos.

6.3 Conservação de amostras

Dependendo do tipo de análise de laboratório a ser realizada com os mosquitos capturados, utilizam-se diferentes métodos de conservação. Estes métodos de conservação são introduzidos na Unidade 7.

Unidade 7
Preparação e Conservação de Amostras de Mosquitos

Objetivos de aprendizagem

Esta unidade descreve:

- **As principais técnicas laboratoriais usadas na análise de amostras de mosquitos e a sua finalidade;**
- **Que partes do corpo do mosquito são usadas em cada técnica, e como preparar e conservar estas amostras.**

As amostras de mosquitos obtidas a partir de colheitas de larvas e adultos podem ser analisadas por uma variedade de técnicas de laboratório, para se obter informações importantes sobre a biologia das espécies de mosquitos e o seu papel como vetores da malária. Estas amostras são geralmente utilizadas para:

- Identificação morfológica de espécies e complexos de espécies, para determinar populações de mosquitos vetores;
- Determinação do estado gonotrófico, para estudar o comportamento de repouso;
- Determinação da idade fisiológica e inseminação das fêmeas, para estudar a longevidade e a sobrevivência da população de mosquitos;
- Deteção de parasitas da malária nos mosquitos e determinação de taxas esporozoíticas;
- Determinação da origem da refeição de sangue, para estudar as preferências de hospedeiro;
- Análises citogenéticas e moleculares, para a identificação de espécies gémeas;
- Análise moleculares, para estudar genes associados à resistência a inseticidas.

7.1 Principais técnicas laboratoriais

As seguintes técnicas laboratoriais são frequentemente utilizadas para analisar amostras de mosquitos de campo, obtidas nos levantamentos entomológicos.

Identificação morfológica de espécies

Além da diferenciação entre anofelíneos e culicíneos, as estruturas morfológicas podem também ser usadas na identificação de espécies/complexos de espécies de anofelíneos (ver também a secção 3.5 da Unidade 3). Isto pode ser realizado através da observação de características específicas de espécies, tanto nos imaturos como nos adultos. Para tal, os mosquitos devem ser preservados em muito bom estado. Os adultos são mantidos secos dentro de caixas entomológicas com algodão e papel de seda, para evitar a perda de escamas durante o transporte. As larvas são preservadas em tubos com etanol a 80%. Os métodos de

identificação envolvem: i) a montagem dos mosquitos entre lâmina e lamela (imaturos ou partes do corpo de adultos), para observação ao microscópio; e ii) montagem de mosquitos adultos em duplo-alfinete para observação ao estereomicroscópio. A identificação envolve a utilização de chaves taxonómicas. Estas técnicas de identificação serão abordadas no curso de nível intermédio.

Disseção de mosquitos

As disseções são usadas para isolar certos órgãos internos da fêmea do mosquito, para observação microscópica. Estes incluem:

- A espermateca, para determinar se fêmea está inseminada;
- Os ovários, para determinar a idade fisiológica da fêmea (p. ex. estado de paridade);
- O estômago, para detetar oocistos de parasitas da malária;
- As glândulas salivares, para detetar esporozoítos de parasitas da malária.

Para serem dissecados, os mosquitos devem ser mortos, ou anestesiados no congelador, imediatamente antes da dissecção. Isto implica o transporte de mosquitos vivos do campo, seja em copos de papel ou em gaiolas, para o laboratório.

Existem outras técnicas mais sofisticadas, que fornecem respostas a questões específicas relacionadas com a biologia da transmissão da malária. Estas serão resumidas nas secções seguintes.

Ensaios enzimáticos de imunoadsorção (ELISA)

Estas técnicas imunoquímicas utilizam anticorpos para detetar antigénios específicos (proteínas) de interesse. Na entomologia da malária, dois métodos ELISA são amplamente utilizados:

- **Circunsporozoíto-ELISA (CS-ELISA):** Este ensaio deteta a proteína circunsporozoítica (CS) que cobre a superfície exterior do esporozoíto da malária. É, portanto, um indicador da presença da fase infetante do parasita da malária. Esta proteína começa a ser expressa quando o esporozoíto está ainda dentro do oocisto maduro, no estômago. Por conseguinte, apenas a cabeça e o tórax da fêmea é analisado, para assegurar que, se for detetada CS, esta terá sido produzida por esporozoítos que atingiram as glândulas salivares, e que a fêmea está assim pronta para inocular os parasitas da malária. Para este ensaio, os mosquitos podem ser mantidos secos à temperatura ambiente, dentro de tubos preenchidos com sílica gel e algodão.
- **ELISA para identificar refeições sanguíneas:** Este ensaio é utilizado para detetar a origem da refeição de sangue que um mosquito fêmea fez, antes de ser capturado. Podem ser utilizados vários anticorpos que detetam antigénios específicos do sangue de diferentes hospedeiros (p. ex. humano, bovino, porco, cão, galinha). A refeição sanguínea da fêmea (recém-alimentada) é colhida por esmagamento do abdómen num papel de filtro. As manchas de sangue são secas e conservadas à temperatura ambiente, até à realização do ensaio.

Análise citogenética

Esta técnica consiste na preparação de cromossomas politénicos, para a observação microscópica de padrões de bandas nos cromossomas, que podem ser específicos (únicos) de espécie ou polimórficos (variáveis). Estes cromossomas politénicos ou "gigantes" ocorrem nas células de apenas certos tecidos/órgãos do mosquito e só em certas fases de vida ou sexos. Por exemplo, em *An. gambiae*, os cromossomas politénicos são encontrados nos ovários das fêmeas semigrávidas e nas glândulas salivares de larvas L4. A conservação de amostras para análise citogenética é normalmente feita em solução de Carnoy (1 parte de ácido acético, 3 partes de etanol absoluto), e mantidas a 4°C (frigorífico), ou -20°C (congelador) durante longos períodos de armazenamento.

Análise molecular de ADN/ARN

Estas técnicas são geralmente usadas para diferenciar os membros de um complexo de espécies gémeas ou para estudar genes de interesse, tais como genes associados à resistência aos inseticidas. As técnicas baseadas no ADN permitem identificar polimorfismos (variações) genéticos nos genes de interesse em populações de mosquitos. As técnicas baseadas no ARN são usadas para estudar o nível de expressão destes genes.

O ADN é uma molécula muito estável, o que facilita a preservação de espécimes para a sua extração. Normalmente, os mosquitos são conservados secos (em tubos com sílica gel e algodão) ou em etanol a 80%, à temperatura ambiente. Além disso, dependendo das técnicas, pode ser obtido ADN suficiente a partir de pequenas partes do mosquito (p. ex. uma perna).

Por outro lado, o ARN é muito instável, o que faz com que a preservação de mosquitos seja mais complicada, especialmente em condições de campo. Idealmente, os mosquitos devem ser mortos e imediatamente armazenadas em nitrogénio (azoto) líquido (-180°C) ou à temperatura de -80°C. O uso de conservantes especiais, tais como o *RNAlater®*, permite manter as amostras à temperatura ambiente ou no frigorífico (4°C), mas apenas durante algumas horas ou dias.

Para a conservação de mosquitos para estudos moleculares, é importante o uso de um tubo por cada mosquito (ou parte do corpo), a fim de evitar a contaminação entre mosquitos, como poderia acontecer se vários mosquitos fossem colocados juntos no mesmo tubo.

7.2 Preparação de amostras de mosquitos

Quando se preparam amostras para análises laboratoriais, diferentes partes do corpo de um único mosquito podem ser analisadas por técnicas diferentes. Por exemplo, para uma fêmea semigrávida, a cabeça e o tórax podem ser mantidos para CS-ELISA, o abdómen pode ser dissecado para se recuperar os ovários para análise citogenética e as pernas podem ser utilizadas para a extração de ADN. A Tabela 3 descreve as partes do corpo do mosquito que são usadas para diferentes técnicas laboratoriais e a forma como estas são preservadas.

Tabela 3. Conservação de partes do corpo de mosquitos a serem usadas em técnicas laboratoriais

Técnica	Material biológico	Estado gonotrófico	Meio de conservação	Temperatura de conservação
Extração de ADN	Mosquitos inteiros ou partes	Qualquer	Adultos: Sílica gel e algodão Larvas: Etanol 80%	Temperatura ambiente (seco)
Extração de ARN	Mosquitos inteiros (ou partes)	Qualquer	Azoto líquido *RNAlater®*	-180°C (Azoto líquido) -20°C ou -80°C (*RNAlater®*)
Citogenética	Ovários	Semigrávida	Solução de Carnoy	-20°C e 4°C
CS-ELISA	Cabeça e tórax	Qualquer	Sílica gel e algodão	Temperatura ambiente (seco)
ELISA refeição sanguínea	Abdómen (sangue)	Recém-alimentada	Papel de filtro Whatman n°1.	Temperatura ambiente (seco)

Para que estes procedimentos sejam bem aplicados, é imprescindível adotar um bom sistema de marcação e identificação das amostras. Todos os tubos (e papéis de filtro) que contêm partes do corpo do mesmo mosquito devem ser marcados com o mesmo número ou código de amostra. Os códigos precisam de ser informativos, simples e inequívocos. A marcação é complementada com uma base de dados que descreve cada mosquito amostrado.

Durante o processamento das amostras, é muito importante manipular os mosquitos com cuidado para evitar contaminações. Sempre que possível, deve-se utilizar materiais descartáveis e esterilizar, pela chama, os materiais de disseção (pinças e agulhas) entre amostras.

Os tubos que contêm líquidos de conservação (p. ex. etanol, solução de Carnoy) devem ser marcados com etiquetas de papel vegetal, escritas a lápis e inseridas no interior dos tubos. Tubos com sílica gel e algodão podem ser marcados com marcadores de tinta permanente. As marcações podem ser protegidas com fita adesiva transparente.

7.3 Equipamentos e materiais essenciais

Principais equipamentos: Estereomicroscópio e microscópio ótico.

Materiais: Pinças entomológicas, agulhas de disseção, alfinetes entomológicos, plasticina, lâminas, lamelas, lamparina, algodão, tubos de plástico (0,5 ml, 1,5 ml, 15 ml), vidros de laboratório diversos, papel de filtro (Whatman n° 1), marcadores de tinta permanente, lápis, etiquetas de papel (papel vegetal), fita adesiva, livro de registos.

Reagentes: Etanol absoluto, água destilada, ácido acético, sílica gel, meio de montagem para preparações microscópicas (p. ex. Entellan®).

7.4 Boas práticas laboratoriais

- Manter sempre o laboratório limpo e organizado.
- Usar máscaras e luvas de proteção ao manusear reagentes tóxicos ou perigosos. Ler o folheto de segurança dos reagentes antes de os usar.
- Limpar e esterilizar os materiais de dissecção entre espécimes.
- Usar sempre um tubo diferente para cada parte do mosquito.
- Marcar os tubos sempre da mesma maneira, com caligrafia legível.
- Registar corretamente as informações sobre cada mosquito processado e manter a base de dados atualizada.
- Cuidar bem dos microscópios e estereomicroscópios.

Unidade 8
Índices de Transmissão e Fatores que Afetam a Transmissão da Malária

Objetivos de aprendizagem

Os padrões de transmissão da malária diferem consoante as áreas geográficas. Esta unidade irá proporcionar conhecimentos básicos sobre:

- **Os métodos utilizados para determinar se uma espécie de mosquito é vetor de malária;**
- **Indicadores entomológicos de transmissão e como calcular índices de transmissão;**
- **Alguns dos fatores que afetam a transmissão da malária.**

8.1 Determinar se uma espécie de mosquito transmite malária

Para se concluir que uma espécie é vetor de malária, é importante demonstrar que:

- Existe contato entre o mosquito e os seres humanos e que o mosquito se alimenta de sangue humano;
- Existe uma relação, tanto no espaço como tempo, entre o mosquito e os casos de malária locais;
- As glândulas salivares do mosquito contêm esporozoítos (a fase do parasita da malária que infeta os seres humanos).

Para demonstrar os pontos acima descritos, são necessárias várias informações entomológicas, nomeadamente:

- A presença e abundância do mosquito;
- O comportamento alimentar do mosquito: onde e quando pica, e qual o hospedeiro em que faz refeição sanguínea;
- Idade ou paridade da população do mosquito;
- A percentagem de mosquitos que estão infetados com esporozoítos.

A informação acima mencionada pode ser obtida a partir de estudos entomológicos, utilizando algumas das técnicas de amostragem que foram apresentadas na Unidade 6, e a partir dos quais os seguintes indicadores entomológicos[5] podem ser calculados:

[5] As abreviaturas dos índices que serão descritos são derivadas da Língua Inglesa, obtendo-se assim uma uniformização entre as diversas traduções deste manual.

- Hábito de repouso;
- Taxa de agressividade para os humanos;
- Longevidade;
- Taxa esporozoítica;
- Índice de antropofilia;
- Taxa Entomológica de Inoculação (EIR);
- Capacidade vetorial.

8.2 Técnicas para incriminação de vetores

Determinação do estado de digestão do sangue e de desenvolvimento dos ovos

Dependendo da fase de digestão de sangue e de desenvolvimento de ovos, ou seja, a fase do ciclo gonotrófico, o abdómen do mosquito fêmea assumirá uma determinada coloração e forma (Fig. 20):

- *Não-alimentada* – abdómen vazio (sem sangue);
- *Recém-alimentada* – vermelho vivo, com os ovários (parte branca) na ponta posterior do abdómen;
- *Semigrávida* – cor vermelho escuro ocupa 3-4 segmentos e os ovários/ovos (brancos) ocupam o resto do abdómen;
- *Grávida* – o sangue está ausente ou forma uma pequena mancha preta na superfície ventral do abdómen e os ovários/ovos ocupam quase todo abdómen.

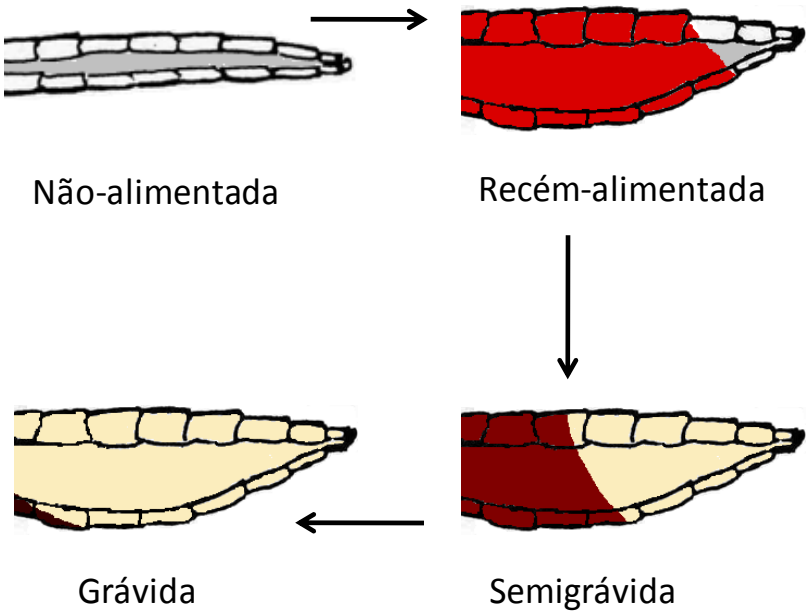


Figura 20. Aparência do abdómen de um mosquito fêmea consoante o seu estado gonotrófico

Paridade

A disseção do abdómen e a observação microscópica da morfologia dos ovários pode determinar:

- Se a fêmea colocou ovos pelo menos uma vez na sua vida – fêmea parida;
- Se a fêmea ainda não colocou ovos – fêmea nulípara.

Isto permite estimar da taxa de paridade da população de mosquitos, ou seja, a proporção de fêmeas paridas, um parâmetro que reflete a idade da população. Populações mais velhas têm taxas de paridade mais elevadas. Populações mais velhas são mais propensas a transmitir a malária, porque os mosquitos precisam de sobreviver o tempo necessário para o parasita se desenvolver no seu interior, além de necessitarem de realizar pelo menos duas refeições de sangue para transmitir o parasita.

Infecciosidade da população

A presença de esporozoítos nas glândulas salivares do mosquito indica que o mosquito é capaz de transmitir os parasitas da malária aos humanos. Isto pode ser determinado através de dissecção e exame microscópico das glândulas salivares de mosquitos, ou por uma técnica de ELISA. Com estes dados, pode-se estimar a taxa esporozoítica de uma população de mosquitos.

Índice de antropofilia (HBI)

Uma técnica de ELISA pode também ser usada para determinar a origem da refeição sanguínea que um mosquito fêmea realizou, determinando-se a assim se esta se alimentou de um hospedeiro humano ou de outro animal. À proporção de fêmeas recém-alimentadas, capturadas em repouso, que se alimentaram em humanos, designa-se de Índice de Antropofilia.

8.3 Estimativa de índices de transmissão

Esta secção descreve como estimar alguns dos parâmetros entomológicos mais importantes utilizados para caracterizar a transmissão da malária por uma população de vetores. Alguns parâmetros, tais como a longevidade ou a sobrevivência, requerem fórmulas matemáticas complexas e serão abordados no curso de nível intermédio.

Densidade de mosquitos em repouso no interior das habitações (D)

A densidade de mosquitos em repouso no interior é calculada da seguinte forma:

- Realizam-se colheitas de mosquitos em repouso no interior de um número de casas selecionadas numa área, pelo método de colheita com lençol e piretrinas (CLP). Normalmente, as casas amostradas deverão ter tamanhos semelhantes;
- Os mosquitos capturados são separados e contados por género e espécie;
- O número total de mosquitos fêmea capturado para cada espécie é dividido pelo número total de casas amostradas;
- Normalmente, a amostragem é efetuada em duas ou três noites por mês e a média das três noites é calculada;
- Densidades em repouso são assim expressas como o número de fêmeas, por casa, por noite. Por exemplo:
  - Assumindo que um total de 765 fêmeas, de uma dada espécie de mosquito, foi capturado por CLP em quatro casas, durante três noites consecutivas, então,

Densidade no interior (D) = número de fêmeas ÷ número de casas ÷ número de noites

D = 765 fêmeas ÷ 4 casas ÷ 3 noites = 63,8 fêmeas/casa/noite

Taxa de agressividade para o Homem (ma)

A taxa de agressividade (ma) é expressa como o número de picadas que uma pessoa recebe de uma dada espécie de vetor, por noite. Este parâmetro pode ser estimado diretamente a partir de colheitas sobre humanos:

- Dividindo o número total de mosquitos capturados da mesma espécie pelo número total de coletores.

- Quando as colheitas são feitas durante a noite inteira (ou seja, 12 horas), a taxa de agressividade é expressa como o número de picadas, por humano, por noite:

Taxa de agressividade (ma) = número de mosquitos capturado ÷ número de coletores

- Quando as colheitas são realizadas somente durante algumas horas da noite, o número total de mosquitos capturados deve ser dividido pelo número total de coletores e pelo tempo total de colheita. Por exemplo:
  - Assumindo que 5 coletores capturaram 150 mosquitos em 4 horas de colheita, a taxa de agressividade seria:

Taxa de agressividade (ma) = Total de mosquitos ÷ Total de coletores ÷ Total de horas de colheita

ma = 150 mosquitos ÷ 5 coletores ÷ 4 horas = 7,5 picadas/humano/hora

Um método indireto de calcular a taxa de agressividade é a partir das colheitas com lençol e piretrina:

- Todas as fêmeas recém-alimentadas (**F**) capturadas são separadas por espécie e contadas;
- O número total de fêmeas capturadas de uma espécie é dividido pelo número total de pessoas (**W**) que passaram a noite nos quartos ou divisões da casa em que se realizaram as colheitas. Por exemplo:
  - Assumindo que 63 fêmeas recém-alimentadas (**F**) foram capturadas em 3 casas (quartos) numa noite e que um total de 8 pessoas (**W)** dormiu nessas 3 casas (quartos) durante essa noite, então:

ma = **F** ÷ **W** = 63 ÷ 8 = 7,9 picadas por humano por noite

Os pressupostos para esta estimativa indireta são:

- Todas as fêmeas recém-alimentadas fizeram a refeição sanguínea nos ocupantes da casa em que foram capturadas, durante a noite que antecedeu a colheita;
- Nenhuma fêmea recém-alimentada saiu da casa em que se alimentou, até ao momento da colheita.

Se o índice de antropofilia da espécie é conhecido, então a taxa de agressividade calculada a partir das colheitas com lençol e piretrina pode ser ajustada através da multiplicação do valor obtido (ma) pelo valor do índice de antropofilia.

Índice de endofagia e exofagia

Os índices de endofagia e exofagia podem ser calculados diretamente a partir dos valores das taxas de agressividade ao Homem, obtidas pelas colheitas sobre humanos. Este método envolve:

- Efetuar colheitas sobre humanos com equipas de coletores posicionados dentro e fora das casas, ao mesmo tempo;

- Calcular taxas de agressividade dentro e fora das casas;
- Calcular o índice de endofagia como a proporção de fêmeas de uma dada espécie que pica no interior das casas (sendo a proporção de fêmeas que pica fora das casas o índice de exofagia). Por exemplo:
  - Assumindo que em 4 horas de colheita sobre humanos, dois coletores capturaram 168 *An. gambiae* fêmea dentro de casa, e que nas mesmas 4 horas dois outros coletores capturaram 122 *An. gambiae* fêmea no exterior das habitações. Então:

1. A taxa de agressividade no interior é:

ma(i)=168 fêmeas ÷ 2 coletores no interior ÷ 4 horas de colheita = 21,0 picadas/Homem/hora

2. A taxa de agressividade no exterior é:

ma(o)=122 fêmeas ÷ 2 coletores no exterior ÷ 4 horas de colheita = 15,3 picadas/Homem/hora

3. O índice de endofagia (ENGI) é então:

   ENGI = ma(i) ÷ [ma(i) + ma(o)] = 21,0 ÷ (21,0 + 15,3) = 0,58

4. O índice de exofagia (EXGI) é então:

   EXGI = ma(o) ÷ [ma(o) + ma(i)] = 15,3÷ (15.3 + 21,0) = 0,42

De notar que ENGI + EXGI será igual a 1.

Taxa esporozoítica (s)

A taxa esporozoítica é a proporção de mosquitos de uma dada espécie que apresentam esporozoítos das glândulas salivares (por dissecção ou CS-ELISA). Por exemplo:

- Assumindo que 1500 fêmeas da mesma espécie de anofelíneo são analisadas por CS-ELISA, das quais 32 são positivas para a proteína circunsporozoítica (um indicador da presença de esporozoítos), então:

Taxa esporozoítica (s) = número de fêmeas positivas ÷ número de fêmeas analisadas

s = 32 fêmeas positivas ÷ 1500 fêmeas analisadas = 0,021 (ou 2,1%)

Índice de antropofilia (HBI)

O índice de antropofilia (HBI) pode ser obtido a partir da análise de refeições sanguíneas, geralmente por técnicas de ELISA, em amostras de mosquitos da mesma espécie, capturadas no campo por colheita de mosquitos em repouso. O HBI é então calculado como a proporção de fêmeas de uma espécie que apresentaram sangue humano no estômago. Índices similares podem ser calculados para outros hospedeiros animais que estejam representados nas refeições sanguíneas identificadas. Por exemplo:

- Assumindo que a análise por ELISA de uma amostra de mosquitos de uma dada espécie de *Anopheles* revelou que 83 fêmeas se alimentaram de sangue humano, 11 de sangue de galinha e 36 de sangue de cão, então:

HBI = n° refeições em humanos ÷ (n° refeições em humanos + n° refeições em galinhas + n° refeições em cães)

HBI = 83 ÷ (83 + 11 + 36) = 0,64

Determinação do hábito de repouso após a refeição sanguínea

Determinar onde o vetor repousa após uma refeição sanguínea é muito importante para avaliar o potencial de uma estratégia de controlo (p. ex. pulverizações com inseticidas residuais) na interrupção da transmissão. O hábito de repouso (f) de uma população de mosquitos pode ser calculado utilizando os outros parâmetros que foram descritos acima:

$$f = [k \times H \times D] \div [N \times P \times M]$$

Onde:

k = constante de correção de 1,16.
H = índice de antropofilia.
D = densidade no interior das habitações, calculada a partir de colheitas com lençol e piretrina.
N = número médio de pessoas por casa.
P = duração do período de repouso após a refeição sanguínea. Este parâmetro obtém-se através da análise do estado abdominal das fêmeas em repouso. P = 1 + (número de fêmeas semigrávidas e grávidas ÷ número de fêmeas recém-alimentadas).
M = taxa de agressividade para o Homem.

Taxa Entomológica de Inoculação (EIR)

É o número de picadas potencialmente infetantes recebidas por pessoa, por noite. Apesar de haver formas mais complexas de estimar a transmissão de malária, uma maneira simples é o cálculo da EIR:

EIR = [Taxa de agressividade ao Homem (ma)] x [Taxa esporozoítica (s)]

Por exemplo, assumindo que uma dada espécie apresenta uma a taxa de agressividade ma = 7,9 picadas/humano/noite e uma taxa esporozoítica s = 0,003, então:

TEI = ma x s = 7,9 x 0,003 = 0,02 picadas infetantes/pessoa/noite

Isto significa que, no espaço de um mês (31 dias) prevê-se que a população de vetores daquela espécie faça 0,62 picadas infetantes na população humana. Da mesma forma, o TEI anual para esta espécie será cerca de 7 (0,02 x 365 dias) picadas infetantes por ano.

8.4 Fatores que afetam a transmissão da malária

A intensidade da transmissão da malária é afetada por fatores ambientais e antropogénicos/ demográficos. Os fatores ambientais podem afetar de diferente forma as espécies diferentes. Os principais fatores ambientais que afetam a transmissão da malária incluem:

Chuvas (precipitação): Em regiões subtropicais e tropicais, a variação da precipitação é o principal fator responsável pela sazonalidade da abundância da maioria das espécies de mosquito. As chuvas originam os criadouros temporários que são fundamentais para o aumento da densidade populacional de algumas espécies de vetores e consequentes picos de transmissão. Por exemplo, em África, há geralmente uma correlação positiva entre a precipitação e a abundância de *An. arabiensis* e *An. gambiae* s.s. No entanto, esta correlação positiva não se verifica para *An. funestus*.

Temperatura e humidade: Enquanto em regiões de clima temperado a temperatura é o principal fator que influencia a dinâmica populacional dos anofelíneos, este efeito parece ser comparativamente menos evidente em climas tropicais. Os mosquitos anofelíneos tornam-se inativos a temperaturas frias. Temperaturas frias na água dos criadouros podem retardar o desenvolvimento das larvas e a emergência dos adultos. No entanto, a longevidade do mosquito diminui significativamente com temperaturas acima de 35°C e humidades relativas do ar abaixo de 50%. As fêmeas inseminadas de *An. gambiae* podem sobreviver longos períodos quentes e secos por estivação. Da mesma forma, algumas espécies de mosquitos de regiões temperadas são conhecidas por hibernar durante o inverno.

Altitude: Os anofelíneos, geralmente, não são encontrados em altitudes acima de 2000 metros. Sabe-se também que a transmissão da malária tende a diminuir com a altitude. A temperatura do ar diminui em média 6,5°C por cada 1000 metros e esta diminuição vai retardar o desenvolvimento do parasita da malária no interior do mosquito, influenciando assim a transmissão da malária.

Fatores antropogénicos/demográficos: Estes incluem o tipo de habitação, as atividades humanas que promovem a disponibilidade de criadouros, a pobreza e os comportamentos relacionados com o nível de compreensão dos riscos de transmissão da malária, bem como práticas socioculturais.

Unidade 9
Noções Básicas de Criação de Colónias de Mosquitos no Laboratório

Objetivos de aprendizagem

Esta unidade proporcionará conhecimentos sobre:

- **As características básicas de um insectário;**
- **Os requisitos básicos para criar larvas e manter adultos de mosquitos anofelíneos no laboratório.**

9.1 O insectário: procedimentos básicos

Um insectário é um local onde os insetos são criados e mantidos em condições ambientais controladas. Os insectários podem ser estruturas simples ou bastante sofisticadas, dependendo da finalidade para a qual são configurados. Para efeitos de rotinas aplicadas ao controlo de vetores, um insectário pode ser uma infraestrutura relativamente barata.

Os insectários são importantes para manter um fornecimento adequado de mosquitos para observação, identificação e análises diversas, tais como testes de suscetibilidade aos inseticidas, estimativas de longevidade e hábitos alimentares dos mosquitos.

Um insectário pode ser constituído por uma pequena sala onde são mantidas as formas imaturas e adultas (Fig. 21), ou, preferencialmente, por duas salas, uma para as fases aquáticas e outra para os adultos.

Figura 21. Imagem de um insectário mostrando tinas com larvas e gaiolas com adultos

Por vezes, um insectário pode conter colónias de mosquitos suscetíveis aos inseticidas, ou colónias derivadas de populações naturais locais. Nestas situações, é essencial que a colónia suscetível não seja contaminada com mosquitos das populações locais.

Um insectário deve ser construído com o objetivo central de prevenir a fuga ou a entrada de mosquitos. Geralmente, tem um teto baixo (não mais 2,20 metros), piso de cimento e paredes pintadas com tinta clara (branca ou quase branca). Estas características são necessárias para detetar mosquitos adultos que escapem das gaiolas. As portas e as janelas devem ser protegidas com tela mosquiteira. Além disso:

- Deverá haver um sistema de segurança adequado para evitar a entrada de pessoas não autorizadas;
- O mobiliário deve ser à prova de ferrugem (aço inoxidável, fibra de vidro, plástico ou madeira polida). As pernas dos móveis (estantes, mesas) devem estar isoladas do solo (geralmente usando recipientes com óleo) e afastadas das paredes, para evitar a invasão de formigas e outros insetos rastejantes.

É essencial que haja um conhecimento aprofundado das condições necessárias à sobrevivência das espécies de mosquitos a manter (temperatura, alimentação, humidade e luz) para que estas sejam criadas com sucesso no insectário.

Deve-se tomar muito cuidado para evitar o crescimento microrganismos, pois tal poderá afetar, severamente, a sobrevivência das colónias de insetos. Um insectário deve ser limpo e organizado. Deve-se ainda assegurar que nenhum inseticida ou químico é introduzido no insectário.

Deve-se evitar que a comida dos insetos crie bolor. A comida das larvas deve ser guardada no frigorífico e o alimento dos adultos (solução de açúcar a 10%) deve ser preparado em pequenas quantidades, consoante o necessário. A água com açúcar para os adultos é particularmente propensa ao crescimento microbiano e, como tal, deve ser mudada regularmente.

Deve-se controlar, regularmente, possíveis pragas, em particular formigas e baratas, pois estas podem alimentar-se dos mosquitos das colónias.

É importante manter uma calendarização rígida das tarefas específicas do insectário (p. ex. quando alimentar as larvas, quando colher os ovos, quando alimentar os adultos com sangue). Uma boa prática é elaborar um cronograma e fixá-lo num local do insectário de fácil acesso e leitura.

É extremamente importante manter a pureza genética das colónias de insetos. Uma colónia de mosquitos perde o seu valor quando fica contaminada com mosquitos de outras espécies e de outras origens (p. ex. do campo). Assim, é importante evitar a contaminação cruzada de ovos, larvas ou a partir de adultos que voem livres no insectário.

Manter uma alimentação adequada é essencial para a sobrevivência e fecundidade da colónia de mosquitos. Da otimização da nutrição, fotoperíodo, temperatura e competição (isto é, das densidades nas tinas de larvas e gaiolas de adultos) irá resultar numa colónia mais produtiva.

9.2 Condições gerais de criação de mosquitos

Ovos

Apenas algumas espécies de *Anopheles* são facilmente criadas em insectário. Para estas espécies, existem duas formas de iniciar uma colónia a partir de mosquitos capturados no campo. Uma colónia pode ser iniciada a partir fêmeas adultas que já tiveram uma refeição de sangue e que são mantidas com uma solução de açúcar até à postura de ovos. Também se pode criar uma colónia a partir de larvas colhidas no terreno, que são criadas no insectário até a fase de adulto, para depois se produzir uma primeira postura de ovos, após se oferecer uma refeição sanguínea às fêmeas. As etapas são as seguintes:

- Capture larvas, ou fêmeas alimentadas de sangue, no campo e coloque-as numa tina (ou gaiola no caso de adultos) no insectário;
- Mantenha-as no insectário com temperatura (27°C) e humidade relativa (80%) estáveis;
- No caso das larvas, mantenha-as até à emergência alimentando-as com comida apropriada. Mantenha os adultos alimentados com uma solução de açúcar a 10%;
- Para obter uma postura de ovos das fêmeas criadas a partir de larvas, é necessário que estas façam pelo menos uma refeição sanguínea;

- Coloque pratos de postura no interior das gaiolas para que as fêmeas possam colocar os ovos. Um prato de postura de ovos pode ser facilmente feito utilizando a parte superior ou inferior de uma placa de Petri, forrada com papel de filtro e preenchida com um pouco de água destilada.
- Os ovos eclodem em 24-48 horas. Inspecione a presença de larvas L1 sob luz branca (Fig. 22).

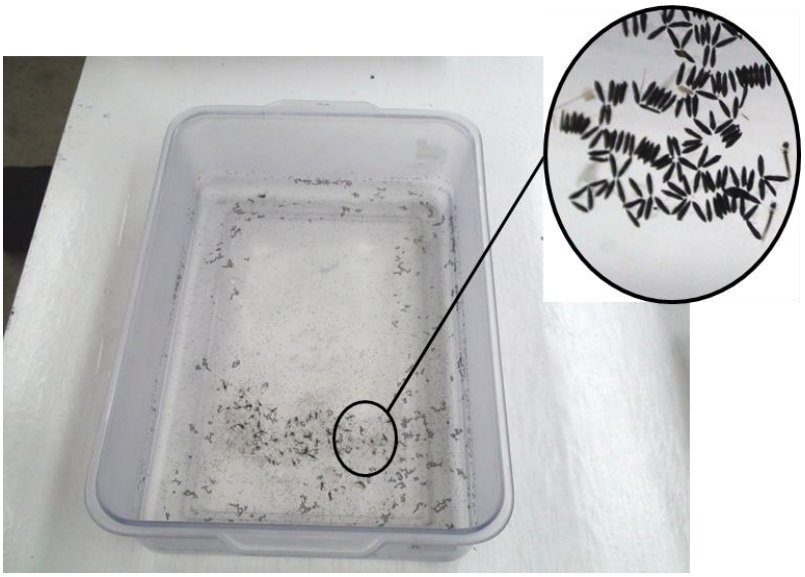


Figura 22. Tina de larvas com ovos e larvas L1

Procedimento básico para eclosão dos ovos

- Preencha a tina de larvas até metade com água destilada e adicione uma solução de levedura a uma concentração final 0,02% (p. ex. 300ml de água e 3ml da solução de levedura 2% p/v);
- Transfira, por lavagem, os ovos do prato de postura para a tina de larvas, cubra a tina com tule e deixe em repouso por 24 horas. Assegure-se que os ovos não se colam nas paredes laterais da tina (estas podem ser forradas com papel de filtro);

Larvas

A temperatura é o fator mais importante que influencia a taxa de crescimento das larvas. Uma temperatura da água estável a cerca de 27°C é crítica para o desenvolvimento das larvas.

A sala das larvas deve ter uma janela de vidro ampla para permitir a entrada da luz do dia. Em alternativa, é necessário um sistema de iluminação artificial que permita uma alternância de luz/escuro (fotoperíodo) de 12 horas. Este é outro fator ambiental importante para o desenvolvimento das larvas.

As larvas devem ser alimentadas duas vezes ao dia, geralmente com comida de peixe moída. Tanto a qualidade como a quantidade de alimento são importantes para a longevidade e fecundidade dos adultos. A mortalidade das larvas pode ser elevada se forem sobrealimentadas. A subalimentação produzirá adultos mais pequenos. As larvas L1 vão requerer mais alimento do que as larvas L4.

Verifique se aparecem algas ou filmes de bactérias dentro das tinas de larvas, pois estas podem levar a um aumento da mortalidade larvar. É importante mudar a água das tinas a cada 1-2 dias e remover todas as larvas mortas nas tinas. As larvas devem ser manipuladas com cuidado, especialmente durante a transferência entre tinas.

As tinas não devem estar sobrelotadas com larvas, pois isso irá afetar o desenvolvimento larvar, devido à competição por alimento e ao canibalismo.

Pupas

Nesta fase, o mosquito não se alimenta. As tinas de larvas devem ser inspecionadas diariamente para se observar a presença de pupas. As pupas são transferidas das tinas de larvas para copos de emergência, que são colocados no interior das gaiolas onde os adultos vão emergir. A separação das pupas pode ser feita com uma pipeta ou uma espátula com rede fina. As pupas são colocadas dentro de copos de emergência preenchidos com água destilada (Fig. 23). Se forem acidentalmente transferidas larvas para o copo de emergência, estas podem ser transferidas de volta para a tina de larvas. Para tal, pode-se rodar a pipeta dentro do copo até a água fazer um remoinho. Desta forma, as larvas ficarão concentradas no fundo e as pupas permanecerão à superfície, facilitando a recolha das larvas com a pipeta. Também se pode adicionar um pouco de água destilada fria à tina para reduzir a atividade de pupas e larvas e facilitar a separação (mas deve ser feito rapidamente, para evitar problemas no desenvolvimento larvar). Tal permite que as pupas possam ser recolhidas com um coador e colocadas nos copos de emergência com água à temperatura ambiente.

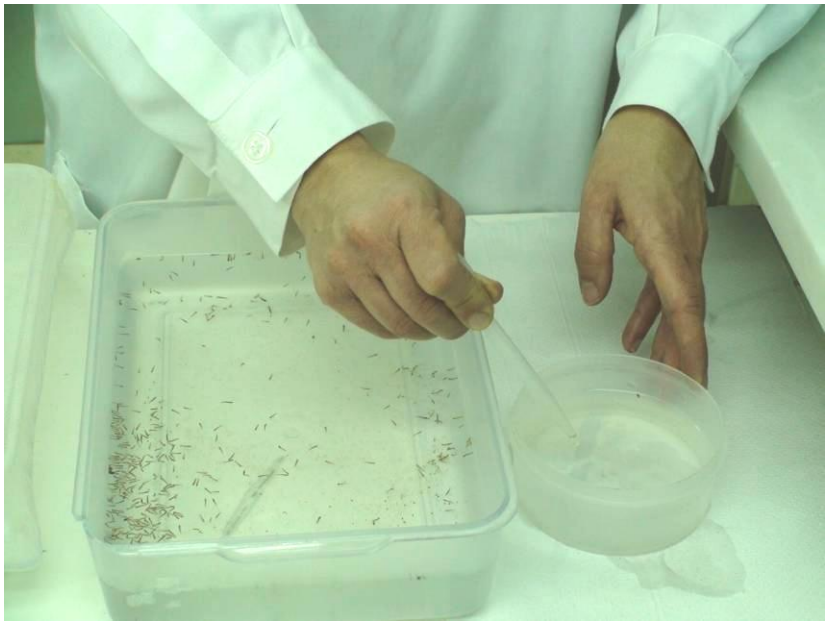


Figura 23. Separação de larvas e pupas com uma pipeta

Adultos

Os adultos podem ser mantidos em copos de papel cobertos com tule, que são baratos e podem armazenar cerca de 10-15 adultos. No entanto, é aconselhável o uso de gaiolas forradas com tule para armazenar um maior número de mosquitos. Os adultos devem ser manipulados com cuidado, utilizando-se aspiradores bucais para a transferência entre gaiolas, sempre que necessário.

A dieta dos adultos afeta a longevidade e a fecundidade. Fêmeas alimentadas apenas com sangue parecem ter maior longevidade do que fêmeas alimentadas com sangue e com solução de açúcar. Geralmente, deve ser dada uma refeição sanguínea às fêmeas a cada 2-3 dias. Para tal, são utilizados animais de laboratório (p. ex. coelhos, porquinhos da índia), que precisam ser mantidos afastados do insectário. Verifique sempre o estado do algodão com a solução de açúcar a 10% nas gaiolas, controlando a presença de fungos. Substitua os algodões com açúcar todos os dias.

Uma humidade relativa estável de 80% (± 10%) é essencial para a sobrevivência dos adultos. Isto pode ser conseguido através da utilização de dispersores de vapor ou humidificadores. A temperatura também deve ser mantida estável a 25°C-27°C.

Unidade 10
Testes de Suscetibilidade Aos Inseticidas e Bioensaios de Cone

Objetivos de aprendizagem

A resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas que são utilizados no seu controlo é um problema crescente a nível mundial, que ameaça a sustentabilidade dos programas de controlo da malária. No final desta unidade, os alunos vão saber como realizar:

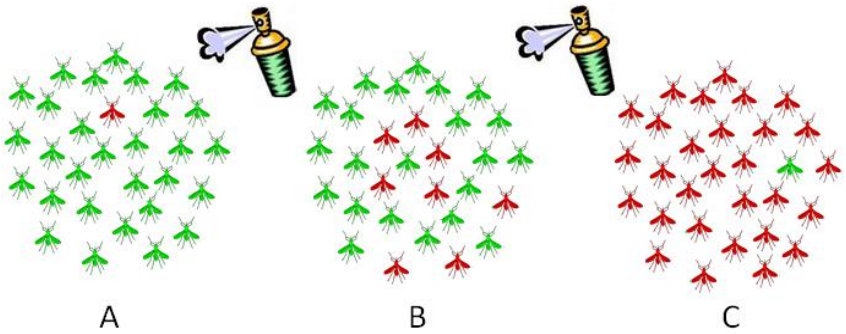
- **O teste da OMS para determinar a suscetibilidade de vetores aos inseticidas;**
- **O bioensaio da OMS para determinar a efeito residual de inseticidas pulverizados em superfícies;**
- **O bioensaio de cone da OMS para determinar a eficácia de mosquiteiros inseticidas de longa duração**

10.1 Porquê determinar a suscetibilidade de vetores de malária aos inseticidas?

Se um vetor é suscetível a um inseticida, significa que vai morrer quando entrar em contato com o inseticida, quando este é aplicado na dose recomendada para uma dada intervenção (p. ex. pulverização residual intradomiciliar, mosquiteiro tratado, larvicida). Uma redução da suscetibilidade significa que o vetor se torna cada vez mais tolerante ao inseticida, até um ponto em que se torna resistente.

Se um vetor desenvolve resistência a um inseticida, significa que ele pode sobreviver à dose que em circunstâncias normais o teria morto, o que pode comprometer a eficácia da intervenção. Por conseguinte, é importante conhecer o nível de suscetibilidade das populações locais de vetores aos inseticidas a serem utilizados na intervenção.

A resistência aos inseticidas resulta da interação entre a variabilidade genética (mutação), pressões de seleção, fluxo genético e história de vida das populações de mosquitos (Fig. 24).



A. Mutações genéticas que conferem resistência aos inseticidas geralmente ocorrem a uma taxa muito baixa em populações naturais de mosquitos; B: Quando sob a pressão seletiva do inseticida, os mosquitos portadores da mutação (mutantes) vão sobreviver melhor e os mosquitos sem mutação (selvagens), por serem suscetíveis, vão morrer; C: Após várias gerações sob pressão continuada pelo inseticida, os mosquitos mutantes resistentes vão predominar na população.

Figura 24. Seleção de resistência aos inseticidas numa população de vetores

10.2 Preparação amostras de mosquitos para testes de suscetibilidade e bioensaios de cone

Dois métodos são geralmente usados para se obter amostras de mosquitos para estes testes:

- Podem-se capturar larvas do maior número de criadouros que houver na região em estudo (ver Unidade 5). As larvas são criadas em insectário (ver Unidade 9), transferindo-se as pupas, diariamente, para as gaiolas onde os adultos vão emergir. Os adultos emergidos são alimentados com uma solução de açúcar a 10% de açúcar até atingirem 3-5 dias de idade;
- Alternativamente, pode-se capturar fêmeas recém-alimentadas ou grávidas através das técnicas de amostragem de adultos, descritas na Unidade 6. Estas fêmeas são mantidas no insectário, alimentadas com uma solução de açúcar a 10% até realizarem a postura de ovos (ver Unidade 9). A geração resultante é criada até à fase de adulto e estes são mantidos até atingirem 3-5 dias, altura em que podem ser utilizados nos ensaios. Neste caso, deve-se obter ovos de um mínimo de cerca de 50 fêmeas, para garantir uma variabilidade genética adequada. Para algumas espécies (p. ex. *An. funestus* e *An. darlingi*), pode ser difícil obter-se um elevado número ovos a partir de fêmeas mantidas no insectário.

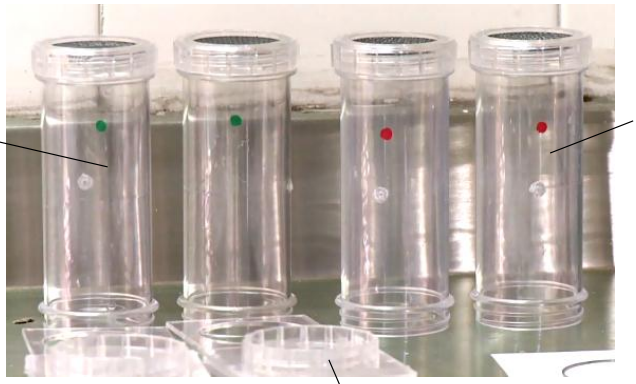
10.3 Determinação da suscetibilidade de mosquitos adultos

Existem dois métodos padronizados para determinação da suscetibilidade aos inseticidas em mosquitos vetores adultos.

Testes de garrafa do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*): Este método é amplamente utilizado em vários países. O protocolo deste ensaio pode ser acedido em www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/bottle/index.htm.

Testes de tubo da OMS: Esta metodologia é fornecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para avaliar a suscetibilidade de fêmeas de mosquitos (WHO, 1998). Nestes testes, mosquitos de uma dada espécie são expostos em tubos especiais que contêm papéis de filtro impregnados com um determinado inseticida dissolvido em óleo, a uma concentração letal (dose discriminante).

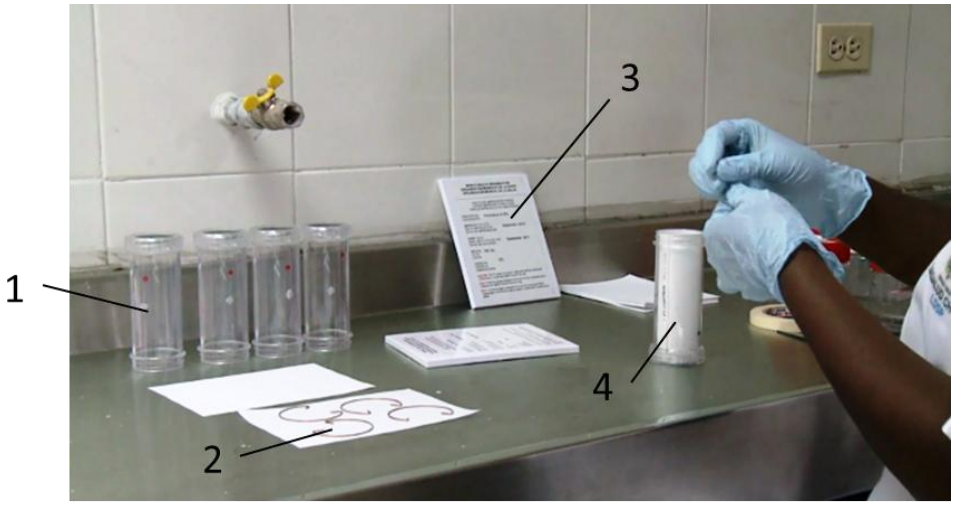
Deve-se salientar que estes métodos medem uma eventual diminuição da suscetibilidade aos inseticidas em populações vetoras. Eles não são uma medida direta de resistência. Para confirmar a resistência, são necessárias análises adicionais para determinar mecanismos subjacentes à diminuição da suscetibilidade.



1. Tubos de repouso/controlo (ponto verde), 2. Tubos de exposição (ponto vermelho), 3. Tampas deslizantes

Figura 25. Testes de tubo da OMS para avaliar a suscetibilidade a inseticidas

O *kit* de testes de suscetibilidade da OMS contém tubos de plástico com 44 mm de diâmetro e 125 mm de comprimento (Fig. 25). Existem dois tipos de tubos. Uns estão marcados com um ponto vermelho e são usados como "tubos de exposição", sendo forrados internamente com papel de filtro impregnado com inseticida e com auxílio de dois clipes de cor cobre. Os outros, marcados com um ponto verde, servem como "tubos de repouso", e têm as suas paredes internas revestidas com papel branco limpo preso por dois clipes de cor prateada (Fig. 26).



1. Tubos de exposição (ponto vermelho), 2. clipes, 3. Caixa com papéis impregnados, 4. Tubo de repouso/controlo (ponto verde)

Figura 26. Revestimento dos tubos com papéis impregnados

Uma das extremidades de cada tubo está tapada com uma rede de malha fina. Através da outra extremidade, o tubo de repouso é atarraxado a uma tampa deslizante que tem um orifício de 20 milímetros, por onde os mosquitos são introduzidos utilizando um aspirador bucal. O tubo de exposição vai ser enroscado no outro lado da tampa deslizante. A tampa deslizante pode assim ser movida de modo a abrir o orifício entre os dois tubos, permitindo que os mosquitos sejam suavemente transferidos (soprados) do tubo de repouso para o tubo de exposição. Após o período de exposição ao inseticida, devidamente cronometrado, os mosquitos são então soprados de volta para o tubo de repouso.

Em cada teste, um outro tubo (também marcado com um ponto verde) é revestido com um papel impregnado apenas com o óleo que foi usado para dissolver o inseticida. A exposição de mosquitos a este papel serve como controlo do teste. Os passos do teste são:

- Enrosque os tubos de repouso às tampas deslizantes;
- Transfira 15-25 mosquitos fêmea para cada tubo de repouso através do orifício da tampa deslizante. Os mosquitos (alimentados apenas com açúcar) são cuidadosamente colhidos das gaiolas de adultos utilizando um aspirador. Deixe os mosquitos descansar nos tubos de repouso durante 60 minutos;
- Ligue os tubos de exposição (incluindo o controlo) aos tubos de repouso, enroscando-os ao outro lado da tampa deslizante. Abra o orifício da tampa deslizante e sopre suavemente os mosquitos do tubo de repouso para o tubo de exposição;

- Feche a tampa deslizante, retire os tubos de repouso e coloque os tubos de exposição (incluindo o controlo) na posição vertical, mantendo os mosquitos no seu interior por um tempo de exposição de uma hora (duas horas se o inseticida for o fenitrotião). Anote o número de mosquitos caídos nos tubos de exposição em intervalos de 15 minutos;
- Após o período de exposição, transfira os mosquitos de volta para os tubos de repouso. Mantenha os tubos de repouso na posição vertical durante 24 horas. Coloque um pedaço de algodão humedecido sobre a rede que cobre a extremidade do tubo e guarde os tubos numa caixa limpa, arejada e coberta com uma toalha humedecida com água. A temperatura e a humidade dentro da caixa devem ser monitorizadas (25±2°C, 75±10%);
- Vinte e quatro horas após a exposição, conte os mosquitos mortos pelo contato com o inseticida e os mosquitos que morreram na exposição ao controlo;
- Se são testados 25 mosquitos por tubo, devem ser feitas 4-5 réplicas do teste para cada inseticida, de modo a que um mínimo de 100 mosquitos seja testado por inseticida;
- A taxa (ou percentagem) de mortalidade é calculada da seguinte forma:
  - **Mortalidade controlo:** C = (n° mosquitos mortos)/(n° mosquitos expostos) no tubo controlo.
  - **Mortalidade teste**: E = (n° mosquitos mortos)/(n° mosquitos expostos) nos tubos de exposição com inseticida.
  - Se a mortalidade controlo (C) for entre 5% e 20%, o valor da mortalidade teste, E, deve ser corrigido pela fórmula de Abbott:

Mortalidade teste corrigida, E' = [(E- C) / (100-C)] x 100

Em que E é a mortalidade teste (não-corrigida) e C é a mortalidade controlo, ambas expressas em percentagem.

Por exemplo, se a mortalidade controlo for 10% e a mortalidade teste não-corrigida for 40%, a mortalidade teste corrigida será [(40 – 10)/100 – 10)] * 100 = 33%.

  - Se a mortalidade controlo for menor que 5%, não é necessário corrigir a mortalidade teste.
  - Se a mortalidade controlo for maior que 20%, o teste deve ser eliminado.
- Interpretação dos resultados:
  - Taxas de mortalidade teste entre 98% e 100% indicam suscetibilidade.
  - Taxas de mortalidade teste entre 80% e 97% sugerem possível resistência. É aconselhável realizar mais testes, com uma maior amostra de mosquitos, para confirmar o nível de resistência da população vetora.
  - Taxas de mortalidade inferiores a 80% indicam resistência.

Análises bioquímicas e moleculares podem ainda ser utilizadas para identificar os mecanismos envolvidos nos níveis de resistência detetados. Isto irá permitir a implementação de medidas eficazes de manejo das resistências.

10.4 Eficácia residual de inseticidas em superfícies pulverizadas (WHO, 1998, 2005)

A eficácia de um inseticida residual sobre uma superfície pulverizada é determinada por bioensaios de cone da OMS. Estes ensaios consistem na verificação da mortalidade de mosquitos vetores de uma dada espécie, quando expostos à superfície pulverizada, em intervalos de semanas ou meses após a pulverização. Esta técnica também pode ser utilizada para realizar um controlo de qualidade de uma operação de pulverização residual. É também utilizada para determinar a eficácia de um inseticida residual em mosquiteiros tratados.

O bioensaio de cone da OMS é composto por cones de plástico, fita adesiva esponjosa, aspirador bucal com a extremidade dobrada, aspirador bucal normal ou tubos de sucção, papel, cartão, pregos pequenos (pioneses), martelo, algodão, copos de papel cobertos com tule, elásticos, marcadores de tinta permanente, gaiola de mosquitos, caixa para conservação de mosquitos e toalhas. Os cones de plástico são apresentados na Fig. 27.

Figura 27. Bioensaio de cone da OMS aplicado numa parede

O procedimento do ensaio é o seguinte:

- Forre as margens da base dos cones de plástico com a fita adesiva esponjosa;
- Fixe os cones sobre a superfície pulverizada com a fita adesiva e/ou os pregos. Cones são fixos a três alturas diferentes da superfície a ser testada (baixa, média e alta);
- Prenda um quadrado de cartão grosso, limpo e sem inseticida, na superfície a ser testada e fixe sobre o cartão os cones de plástico que serão usados como controlo;

- Introduza 10 mosquitos criados em insectário com 3-5 dias de idade, de uma colónia de *Anopheles* totalmente suscetível a inseticidas, em cada cone e tape a abertura dos cones com um pedaço de algodão. Utilize um aspirador bucal diferente para introduzir os mosquitos nos cones de controlo;
- Depois de um determinado tempo de exposição (normalmente 30 minutos), retire cuidadosamente os mosquitos dos cones e transfira-os para os copos de papel devidamente marcados. Utilize um copo diferente por cada cone. Conte o número de mosquitos mortos, ou caídos, no final do período de exposição, mas não os remova, pois alguns dos mosquitos caídos podem mais tarde recuperar;
- Coloque um algodão húmido no topo dos copos de papel e guarde-os numa caixa limpa de inseticida, bem arejada e coberta com uma toalha húmida;
- Após 24 horas, conte o número de mosquitos mortos e calcule a percentagem de mortalidade nos copos que contêm os mosquitos que foram expostos á superfície com inseticida (cones teste) e dos copos contendo os mosquitos expostos ao cartão (cones controlo).
- Se a mortalidade nos cones controlo for entre 5% e 20%, a mortalidade dos cones teste deve ser corrigida pela fórmula de Abbott, tal como acima descrito. Deve-se eliminar o ensaio se a mortalidade controlo for superior a 20%.
- Para cada tipo de parede, o ensaio deve ser repetido em mais do que uma parede dentro da mesma casa e também em casas diferentes, para se obter uma amostra representativa.

Eficácia residual de inseticidas em mosquiteiros tratados

O procedimento do bioensaio de cone para redes mosquiteiras tratadas é semelhante ao procedimento para superfícies pulverizadas. A principal diferença é que os mosquitos são expostos durante apenas três minutos e em lotes de 5 mosquitos por cone. Dois cones são colocados em cada um dos lados e no topo do mosquiteiro, a diferentes alturas. Como controlo, dois cones são aplicados a um mosquiteiro não-tratado. Os cones podem ser fixos ao mosquiteiro utilizando elásticos de borracha (Fig. 28). O ensaio também pode ser feito retirando a rede e esticando-a numa mesa ou num quadrado de cartão.

Figura 28. Bioensaio de cone da OMS num mosquiteiro tratado

Anexo I Exemplo de um Programa do Curso Básico de Técnicos de Entomologia

Introdução

A malária continua a ser uma das principais causas de doença e de mortalidade infantil nas regiões tropicais do mundo. Esta doença impõe severas restrições ao desenvolvimento económico, sendo uma importante causa de pobreza na maioria dos países em que é endémica. Embora tenha havido um forte incremento no financiamento para o controlo da malária, as metas de redução desta doença estabelecidas pelo Programa *Roll Back Malaria* e pelos Programas Nacionais de Controlo da Malária ainda não foram atingidas em muitos países. Tal deve-se, principalmente, à incapacidade de gerar conhecimento sobre a eco-epidemiologia local da doença, de modo a informar adequadamente as instituições responsáveis pela implementação e gestão do programa. Em particular, a capacidade de monitoramento e vigilância entomológica ainda são, frequentemente, rudimentares. Assim, há uma necessidade urgente dos programas nacionais de controlo da malária formarem um número suficiente de pessoal qualificado, para participar efetivamente das atividades de controlo da malária.

Objetivo do curso

O curso tem como objetivo apoiar os esforços dos Programas Nacionais de Controlo da Malária para desenvolver, a nível regional, uma massa crítica de pessoal treinado que efetue a vigilância e a monitorização entomológica, de modo a orientar as intervenções de controlo de vetores da malária. O curso irá fornecer conhecimentos básicos sobre a importância do controlo de vetores para a redução da doença, a biologia e os métodos de controlo de mosquitos, bem como competências em metodologias padronizadas para a vigilância e monitorização de vetores da malária.

Público-alvo

O curso tem como destinatários, pessoal de organismos distritais de países com malária endémica. Está direcionado aos quadros técnicos que recolhem e reportam indicadores entomológicos locais, para apoio aos programas de controlo de vetores. Estes destinatários possuem, normalmente, formação ao nível secundário ou diplomas de especialização em áreas que se adequem ao estudo da entomologia.

Estrutura do curso

O curso está organizado em 10 unidades de aprendizagem. Cada unidade inclui aulas teóricas, práticas e teórico-práticas. O curso tem a duração de três semanas, mas pode ser encurtado para duas semanas, dependendo das especificidades do país. As primeiras duas semanas são dedicadas à transmissão de conceitos e conhecimentos de base. A primeira semana concentra as aulas teóricas e a segunda as aulas teórico-práticas e práticas. A terceira semana é dedicada à demonstração de métodos e ferramentas de controlo de vetores, à revisão da matéria dada e a aulas de discussão geral. O curso termina com a avaliação dos alunos e do curso.

Avaliação do curso

O curso inicia-se com a realização de um pré-teste, que irá permitir um aperfeiçoamento das metodologias de ensino, de modo a melhor concretizar os objetivos propostos. No fim do curso, os estudantes farão um teste final, para avaliar a aquisição de novos conhecimentos, e responderão a um questionário confidencial para avaliar a qualidade do curso nos seus diferentes componentes.

Conteúdo curricular

Todos os tópicos que são abrangidos pelo curso estão descritos em detalhe no Manual de Entomologia para Formação de Técnicos (nível básico). O manual servirá como documento orientador do curso. A finalidade e os conteúdos principais de cada unidade de aprendizagem estão apresentados na Tabela A-1.

Cronograma do curso

A programação proposta para um curso de três semanas é apresentada na Tabela A-2. Este calendário é flexível e vai depender da logística local e das necessidades dos recetores finais do curso (p. ex. Programas Nacionais de Controlo).

Tabla A-1. Objetivos e conteúdos das unidades de aprendizagem

Unidade	Título	Objetivos	Conteúdos	Tipo de aulas
1	Controlo da malária e o papel da entomologia	No final desta unidade, os alunos serão capazes de reconhecer a importância do controlo de vetores em programas de controlo da malária, as principais ferramentas disponíveis para o controlo de vetores e os princípios básicos para a sua implementação.	• Abordagens para o controlo da malária. • Ferramentas para o controlo de vetores. • Controlo vetorial e princípios para a sua implementação eficaz • Princípios básicos para o planeamento do controlo de vetores de malária. • Principais tipos de levantamentos entomológicos.	Aulas teóricas. Aulas práticas: demonstração das principais ferramentas de controlo de vetorial (mosquiteiros, pulverização residual, larvicidas)
2	Biologia de vetores de malária	No final desta unidade, os alunos saberão descrever o ciclo de vida de um mosquito e designar as principais características biológicas, ecológicas e comportamentais que influenciam a capacidade de um mosquito para transmitir a malária.	• Ciclo de vida do mosquito *Anopheles.* • Principais características bioecologias e comportamentais com importância médica.	Aulas teóricas. Aulas práticas: apresentação dos diferentes estados de desenvolvimento do mosquito, com material de colónia de insectário.
3	Anatomia e identificação de mosquitos	No final desta unidade, os alunos serão capazes de distinguir morfologicamente mosquitos do género *Anopheles*, ao qual pertencem as espécies que são vetores de malária humana, de outros culicídeos que não transmitem a malária humana.	• Principais características morfológicas dos mosquitos (Diptera: Culicidae). • Distinção entre *Anopheles* (subfamília Anophelinae) e outros culicídeos (subfamília Culicinae), nas fases imatura e adulta.	Aulas teóricas. Aulas práticas: observação da morfológica de mosquitos, nomeadamente das características que permitem a identificação de *Anopheles* sp.
4	Diversidade de vetores de malária	Em regiões endémicas, a transmissão da malária é efetuada por várias espécies de mosquito e, em algumas ocasiões, por diferentes subpopulações da mesma espécie. No final desta unidade, os alunos terão adquirido os conceitos e conhecimentos necessários para compreenderem a complexidade dos sistemas vetoriais da malária, na natureza.	• Distribuição geográfica dos vetores da malária, diversidade de habitats que exploram e tipos de adaptação ecológica. • Conceito de complexo de espécies gémeas. • Descrição de algumas das principais espécies/complexos de vetores das Américas, África e Ásia.	Aulas teóricas. Aulas práticas: demonstração do uso de chaves de identificação morfológica para identificar espécies de mosquito (larvas e adultos).
5	Colheita de mosquitos (Larvas)	No final desta unidade, os alunos serão capazes de realizar a amostragem das formas imaturas do mosquito, no âmbito de levantamentos entomológicos necessários à monitorização de vetores.	• Razões para se efetuar estudos larvares. • Tipos de habitats larvares e fatores que podem afetar a produção de adultos de um determinado criadouro. • Métodos de amostragem, processamento e preservação de amostras larvares. • Fatores ambientais usados na descrição de um habitat larvar. • Tratamento e análise de dados.	Aulas teóricas. Aulas práticas: amostragem e identificação de larvas e adultos de mosquitos.
6	Colheita de mosquitos (Adultos)	No final desta unidade, os alunos serão capazes de realizar a amostragem de mosquitos adultos, no âmbito de levantamentos entomológicos necessários à monitorização dos vetores.	• Métodos de colheita de mosquitos adultos (colheitas noturnas sobre humanos/ capturas com lençol e piretrinas; colheitas de mosquitos em repouso no exterior; armadilhas de saída; captura manual ou por aspiração.	Aulas teóricas. Aulas práticas: aplicação de métodos colheita de mosquitos adultos e técnicas de processamento de amostras.

Unidade	Título	Objetivos	Conteúdos	Tipo de aulas
7	Preparação e conservação de amostras de mosquitos	No final desta unidade, os alunos serão capazes de selecionar e aplicar os métodos corretos para o manejo e conservação de amostras de mosquitos, a serem posteriormente usadas em diferentes análises laboratoriais.	• Principais técnicas laboratoriais utilizadas na entomologia da malária (identificação morfológica, dissecções, ELISA, citogenética, análise molecular baseada em ADN/ARN) • Preparação de amostras para as diferentes técnicas. • Materiais e equipamentos essenciais.	Aulas teóricas. Aulas práticas: preparação de amostras para a determinação da origem da refeição sanguínea do mosquito por ELISA e para análises moleculares baseadas em ADN.
8	Índices de transmissão e fatores que afetam a transmissão da malária	No final desta unidade, os alunos terão adquirido conhecimentos sobre os principais fatores que afetam a transmissão da malária. Saberão como recolher informações biológicas para a incriminação de uma espécie como vetor de malária e saberão calcular e interpretar diversos índices de transmissão, entre os quais a Taxa Entomológica de Inoculação.	• Como determinar quais as espécies de mosquito envolvidas na transmissão malária (incriminação do vetor). • Seleção de técnicas para a incriminação de vetores. • Estimativa de parâmetros entomológicos importantes para a caraterização da transmissão (índice de antropofilia, índice de endo/exofilia, índice de endo/exofagia) e estimativa de índices de transmissão, nomeadamente da Taxa Entomológica de Inoculação. • Fatores que afetam a transmissão da malária.	Aulas teóricas. Aulas práticas: determinação dos graus de desenvolvimento gonotrófico e ovárico; dissecção das glândulas salivares e ovários de mosquitos. Aulas T-P: cálculo dos índices de transmissão utilizando os resultados das colheitas de campo.
9	Noções básicas de criação de colónias de mosquitos no laboratório	No final desta unidade, os alunos saberão quais os requisitos para a implementação e gestão de um insectário e os passos principais a serem realizados para o estabelecimento e manutenção de colónias de mosquitos, bem como a utilidade destas para o controlo de vetores da malária.	• Tarefas de rotina no insectário. • Condições gerais para a criação de mosquitos: ovo, larva, pupa e adulto.	Aulas teóricas. Aulas práticas: Colheita de mosquitos no terreno para estabelecimento de uma colónia em insectário.
10	Testes de suscetibilidade aos inseticidas e bioensaios de cone	No final desta unidade, o aluno será capaz de realizar bioensaios para a determinação da suscetibilidade a inseticidas em populações de mosquitos e realizar bioensaios para avaliar a eficácia residual de inseticidas em superfícies tratadas (paredes e mosquiteiros).	• Razões para determinar a suscetibilidade de vetores e a eficácia residual de inseticidas • Teste OMS: avaliação do nível de suscetibilidade de mosquitos adultos a inseticidas. • Teste OMS: determinação da eficácia residual de inseticidas em superfícies tratadas. • Teste de garrafa do CDC: avaliação do nível de suscetibilidade de mosquitos adultos a inseticidas.	Aulas teóricas. Aulas práticas: execução das componentes de campo e de laboratório dos testes para a determinação da suscetibilidade a inseticidas em populações de mosquitos e avaliação da eficácia residual inseticidas em superfícies tratadas

Tabla A-2. Cronograma do curso (semana 1)

Horas	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
9:00	Cerimónia de abertura	Principais intervenções de controlo vetorial (Unidade 1; T)	Incriminação de espécies como vetores de malária (Unidade 8; T)	Preparação e conservação de amostras de mosquitos (Unidade 7; T)	Conclusão das aulas anteriores: análise e interpretação dos resultados. (Unidade 10, P)
9:30					
10:00	Objetivos do curso				
10:30	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*
11:00		Princípios básicos no planeamento de programas de controlo de malária (Unidade 1; T)	Colheitas entomológicas (larvas) (Unidade 5; T)	Porquê determinar a suscetibilidade a inseticidas? (Unidade 10; T)	Estabelecimento e manutenção de colónias de mosquitos. (Unidade 9, T)
11:30	Pré-teste				
12:00	*Almoço*	*Almoço*	*Almoço*	*Almoço*	
12:30					*Almoço*
13:00	Biologia de vetores de malária (Unidade 2; T)	Identificação de mosquitos (Unidade 3; T)	Colheitas entomológicas (adultos) (Unidade 6; T)	Tipos de teste para a determinação de níveis de suscetibilidade a inseticidas (OMS *vs.* CDC (Unidade 10; T)	
13:30					Colheita e transporte de larvas e adultos para o insectário (Unidade 9, P)
14:00				Testes de tubo OMS e de garrafa do CDC; bioensaios de cone da OMS (Unidade 10, P)	
14:30	Princípios básicos para controlo da malária (Unidade 1; T)	Biodiversidade de vetores de malária (Unidade 4; T)			
15:00					*Intervalo para café*
15:30	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	Tarefas de rotina para a manutenção de colónias em insectário (Unidade 9, T-P)
16:00	Importância da entomologia no controlo da malária (Unidade 1; T)	Biodiversidade de vetores de malária (Unidade 4; T)	Estimativa de parâmetros importantes na transmissão da malária (Unidade 8; T)	Continuação da aula anterior (Unidade 10, P)	
16:30					
17:00					

T: Aula teórica; T-P: Aula teórico-prática; P: Aula prática

Tabla A-2. Cronograma do curso (semana 2)

Horas	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
6:00		Saída de campo (identificação de criadouros larvares e colheita de larvas) (Unidade 5, P)		Colheitas com lençol e piretrinas (Unidade 6, P)		
8:00				Colheitas de mosquitos em repouso no exterior e com armadilhas de saída (Unidade 6, P)		
8:30						
9:00	Organização das atividades e materiais da saída de campo (Unidades 5&6, T-P)		Processamento das amostras colhidas nas capturas noturnas (Unidades 3&7, P)		Colheita de larvas (Unidade 5, P)	Processamento das amostras colhidas nas capturas noturnas (Unidades 3&7, P)
10:00				Processamento dos mosquitos capturados (Unidades 3&7, P)		
10:30	*Intervalo para café*					*Intervalo para café*
11:00	Criadouros e controlo larvar (Unidades 1&2, T)	Identificação de mosquitos (larvas) (Unidade 3, P)				Continuação da aula anterior (Unidades 3&7, P)
11:30						
12:00	*Almoço*		*Almoço*	*Almoço*		
12:30		*Almoço*			*Almoço*	*Almoço*
13:00	Preparação de relatórios e aplicação da informação recolhida (Unidades 5&6, T)		Cálculo de parâmetros importantes na transmissão da malária (Unidade 8, P)			
13:30		Identificação de mosquitos (adultos) (Unidade 3, P)		Processamento dos mosquitos capturados (Unidades 3&7, P)	Identificação de mosquitos (larvas) (Unidade 3, P)	
14:00						Cálculo de parâmetros importantes na transmissão da malária (Unidade 8, P)
14:30						
15:00	*Intervalo para café*					
15:30	Identificação de mosquitos (Unidades 3&4, P)		*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	*Intervalo para café*	
16:00		*Intervalo para café*	Continuação da aula anterior (Unidade 8, P)	Tratamento e análise de resultados (Unidade 8, P)	Tratamento de resultados (Unidade 8, P)	
						Intervalo para café
16:30		Preparação das colheitas noturnas sobre humanos e com armadilhas luminosas (Unidade 6, P)			Preparação das colheitas noturnas sobre humanos e com armadilhas luminosas (Unidade 6, P)	
						Cálculo de parâmetros importantes na transmissão da malária (Unidade 8, P)
17:00			Preparação das colheitas com lençol e piretrinas (manhã seguinte) (Unidade 6, P)			
17:30		*Jantar*			*Jantar*	
…						
19:00		Colheitas noturnas sobre humanos e com armadilhas luminosas (Unidade 6, P)			Colheitas noturnas sobre humanos e com armadilhas luminosas (Unidade 6, P)	
22:00						

T: Aula teórica; T-P: Aula teórico-prática; P: Aula prática

Tabla A-2. Cronograma do curso (semana 3)

<table>
<tr><th>Horas</th><th>Dia 1</th><th>Dia 2</th><th>Dia 3</th><th>Dia 4</th></tr>
<tr><td>9:00</td><td rowspan="3">Testes de tubo da OMS
(Unidade 10, P)</td><td rowspan="3">Demonstração de métodos e ferramentas para o controlo vetorial
(Unidade 1, P)</td><td rowspan="3">Revisões dos conceitos teóricos ensinados</td><td rowspan="3">Avaliação dos alunos (teste)</td></tr>
<tr><td>9:30</td></tr>
<tr><td>10:00</td></tr>
<tr><td>10:30</td><td>Intervalo para café</td><td>Intervalo para café</td><td>Intervalo para café</td><td>Intervalo para café</td></tr>
<tr><td>11:00</td><td rowspan="3">Continuação da aula anterior</td><td rowspan="3">Continuação da aula anterior</td><td rowspan="3">Continuação da aula anterior</td><td rowspan="3">Avaliação do curso</td></tr>
<tr><td>11:30</td></tr>
<tr><td>12:00</td></tr>
<tr><td>12:30</td><td rowspan="2">Almoço</td><td rowspan="2">Almoço</td><td rowspan="2">Almoço</td><td rowspan="2">Almoço</td></tr>
<tr><td>13:00</td></tr>
<tr><td>13:30</td><td rowspan="5">Testes de garrafa do CDC
(Unidade 10, P)</td><td rowspan="5">Continuação da aula anterior</td><td rowspan="5">Discussão sobre as aulas práticas efetuadas</td><td rowspan="2">Conclusões sobre o curso</td></tr>
<tr><td>14:00</td></tr>
<tr><td>14:30</td><td rowspan="2">Cerimónia de encerramento</td></tr>
<tr><td>15:00</td><td rowspan="5"></td></tr>
<tr><td>15:30</td></tr>
<tr><td>16:00</td><td>Intervalo para café</td><td>Intervalo para café</td><td>Intervalo para café</td></tr>
<tr><td>16:30</td><td rowspan="2">Testes de cone da OMS
(Unidade 10, P)</td><td rowspan="2">Conclusão da aula anterior</td><td rowspan="2">Conclusão da aula anterior</td></tr>
<tr><td>17:00</td></tr>
</table>

T: Aula teórica; T-P: Aula teórico-prática; P: Aula prática

Anexo II Exemplos de Fichas de Campo para Colheitas de Larvas e Adultos de Mosquito

A. FICHA DE CAMPO PARA LARVAS

A.1. Identificação do local de colheita

Região/país..... **Localidade**.....

Coordenadas geográficas:

- **Latitude**.....
- **Longitude**.....

A.2. Caracterização do criadouro

Tipo

- **Permanente** ☐ **Semipermanente** ☐ **Temporário** ☐

Origem da água (e.*g.* chuva, rio, escorrência, canalização).....

Natureza da coleção de água (*e.g.* poça, arrozal, vala) .....

Características da água (*e.g.* límpida, turva, poluída, escura).....

- **Temperatura**..... **pH**.....

Exposição ao sol

- **Sombrio** ☐ **Parcialmente exposto** ☐ **Exposto** ☐

Presença de vegetação (emergente, submersa, flutuante)

- **Emergente** ☐ **Submersa** ☐ **Flutuante** ☐

A.3. Descrição da colheita

Tempo de colheita (min)..... **Número de caços** .....

Presença de larvas

- **Anofelíneos** ☐ **Culicíneos** ☐ **Negativo** ☐

A.4. Notas

.....

.....

Data..... **Hora da colheita**.....

Nome do coletor.....

B. FICHA DE CAMPO PARA ADULTOS

B.1. Identificação do local de colheita

Região/país..... **Localidade**.....

Coordenadas geográficas:

- **Latitude**.....
- **Longitude**.....

B.2. Tipo de colheita

Capturas sobre humanos: **Interior** ☐ **Exterior** ☐

Colheitas de mosquitos em repouso: **Interior** ☐ **Exterior** ☐

Colheita com lençol e piretrina ☐ **Armadilha de saída** ☐

Outro.....

B.3. Características do local de colheita

Colheitas no interior

- **Tipo de casa e de materiais de construção**.....
- **Número de quartos** ..... **Número de divisões**.....
- **Número de pessoas que dormiram na casa na noite anterior:**
  - **Com rede mosquiteira**..... **Sem rede mosquiteira**.....
- **Tipo de rede mosquiteira**
  - **Sem impregnação** ☐ **Impregnada** ☐ **LLIN** ☐
- **Data da última vez que a casa foi pulverizada com inseticida**.....

Tipo e características de colheitas feitas no exterior (e.g. em abrigos animais, vegetação).....

.....

B.4. Descrição da colheita

Hora da colheita..... **Tempo de duração**..... **Nº de coletores**.....

Presença de mosquitos adultos

- **Anofelíneos** ☐ **Culicíneos** ☐ **Negativo** ☐

A.4. Notas

.....

.....

Nome do coletor..... **Data**.....