

MANUTENÇÃO DE COLÔNIA DE ANOPHELES DARLINGI ROOT, 1926, EM LABORATÓRIO (1)

Geraldo Magela BURALLI (2) & Eduardo Sterlino BERGO (2)

RESUMO

Descreve-se a instalação e manutenção inicial de uma colônia de *An. darlingi*, no município de Araraquara, SP, como parte do programa de pesquisas em malária da Superintendência de Controle de Endemias — SUCEN.

Participando-se de experiência semelhante descrita por CORRÊA na década de 70, apresenta as modificações sugeridas por outros autores e pela experiência de seis meses de funcionamento. A perspectiva é de desenvolvimento de uma colônia com simplificações de técnicas e equipamentos.

São dadas informações sobre alimentação de larvas e alados, duração dos estádios larvais, mortalidade e acasalamento.

UNITERMOS: *Anopheles darlingi* — insetário.

INTRODUÇÃO

A criação em massa de anofelinos em laboratório é vista atualmente como condição precípua ao desenvolvimento de pesquisas em malária já que grande parte dos estudos requer a manutenção do ciclo esporogônio de plasmódios.

A escolha da espécie a ser colonizada recai, em geral, naquelas de comprovada capacidade vetorial e preferencialmente com ampla distribuição geográfica, tanto pela disponibilidade de exemplares para início e reforço do insetário quanto pela facilidade, que se espera, na reprodução das condições ambientais, em laboratório, exigidas pela espécie. Entretanto, é fato conhecido de quantos tenham se dedicado a essa tarefa que certas espécies, aparentemente pouco exigentes de condições climáticas especiais, na verdade devem ter seu desenvolvimento con-

dicionado a alto grau de especialização ecológica, envolvendo biocenoses essenciais e complexas de difícil reprodução⁴.

Nesse sentido, *Anopheles darlingi* tem-se constituído num desafio para os pesquisadores brasileiros. Por ser a espécie de maior importância na veiculação das malárias humanas no país, graças à elevada suscetibilidade a *P. vivax* e *P. falciparum*, endofilia e antropofilia acentuadas e ocorrência relativamente farta em ambientes com diferentes graus de interferência antrópica⁶, tem-se prestado a várias tentativas de colonização artificial, em geral mal sucedidas.

Esse insucesso na manutenção das colônias provavelmente tem desestimulado a publicação de resultados parciais, que se verifica pela es-

(1) Auxílio financeiro do CNPq-Polonoroeste 700349/85.

(2) Superintendência de Controle de Endemias-SUCEN, Rua Paula Souza, 166. CEP 01027 São Paulo, SP, Brasil.

cassa literatura disponível, o que contribui ainda mais para as dificuldades que se enfrenta na sua criação.

Desde os trabalhos pioneiros realizados até 1950, por autores nacionais e estrangeiros, a principal informação disponível provém de comunicações pessoais de técnicos que participaram dessas experiências ou de relatórios de divulgação restrita^{1, 2, 5, 7, 9, 11}. De qualquer forma, pode-se dizer que existe hoje um conhecimento acumulado razoável que permite dar início a uma colônia de *An. darlingi* e que a maior dificuldade se refere a sua manutenção por longos períodos. A análise das experiências referidas mostra que alguns parâmetros fundamentais estão bem estabelecidos como: necessidade de água limpa, de origem natural, para manutenção das larvas; alimentos mais aceitos; exigência de gaiola de grande porte para permitir a corte e cópula e os recipientes de oviposição capazes de simular o criadouro natural de grande profundidade.

Entre esses trabalhos destaca-se o de CORRÊA¹¹ que conseguiu manter no município de Araraquara, SP, por cerca de dez anos, uma colônia cuja produção diária de adultos atingiu, no ápice da sua atividade, a média de 1.500 exemplares.

A experiência atual da SUCEN, buscando a reinstalação da colônia, significa assim uma tentativa de resgatar o conhecimento acumulado por aquele autor e pelos técnicos que o acompanharam. Ela faz parte do programa de pesquisa em malária da autarquia que, no momento pretende manter o cultivo "in vitro" de formas hepáticas do parasita a partir de esporozoítos, além de trabalhos voltados ao estudo da suscetibilidade às drogas antimaláricas.

A nova colônia teve início em maio de 1987, quando se optou por utilizar a mesma metodologia desenvolvida por CORRÊA e a partir daí buscar as adaptações que se julgarem necessárias. A descrição dessas atividades significa o registro de experiência preliminar sujeita, portanto, à crítica e adaptação constantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Instalações, móveis e equipamentos:

O prédio que abriga o insetário projetado e construído especialmente para esse fim, está

situado em Araraquara, SP, a 275 km da Capital.

A área total construída é de 55 m² composta por um laboratório, sala de criação de larvas, sala de criação de alados, sala de criação de coelhos e depósitos, conforme fig. 1. As paredes são revestidas de azulejos e o piso de cerâmica esmaltada. O teto é de laje de concreto, com cobertura de telhas de barro. A entrada do prédio é protegida por dupla porta, sendo uma de tela. Internamente existem cortinas de algodão isolando o hall de entrada e aquele que dá acesso às salas de criação. Todas as janelas são teladas.

O laboratório é equipado com móveis e aparelhos convencionais. A sala de criação de larvas apresenta pequena bancada com pia e estantes de madeira revestindo as paredes. A sala de manutenção de alados contém duas gaiolas para mosquitos e uma mesa de manipulação. As duas salas de criação estão equipadas com aquecedores elétricos e umidificadores. O controle da temperatura e umidade relativa é feito por termômetros e termohigrógrafo.

A iluminação artificial é feita por lâmpadas fluorescentes.

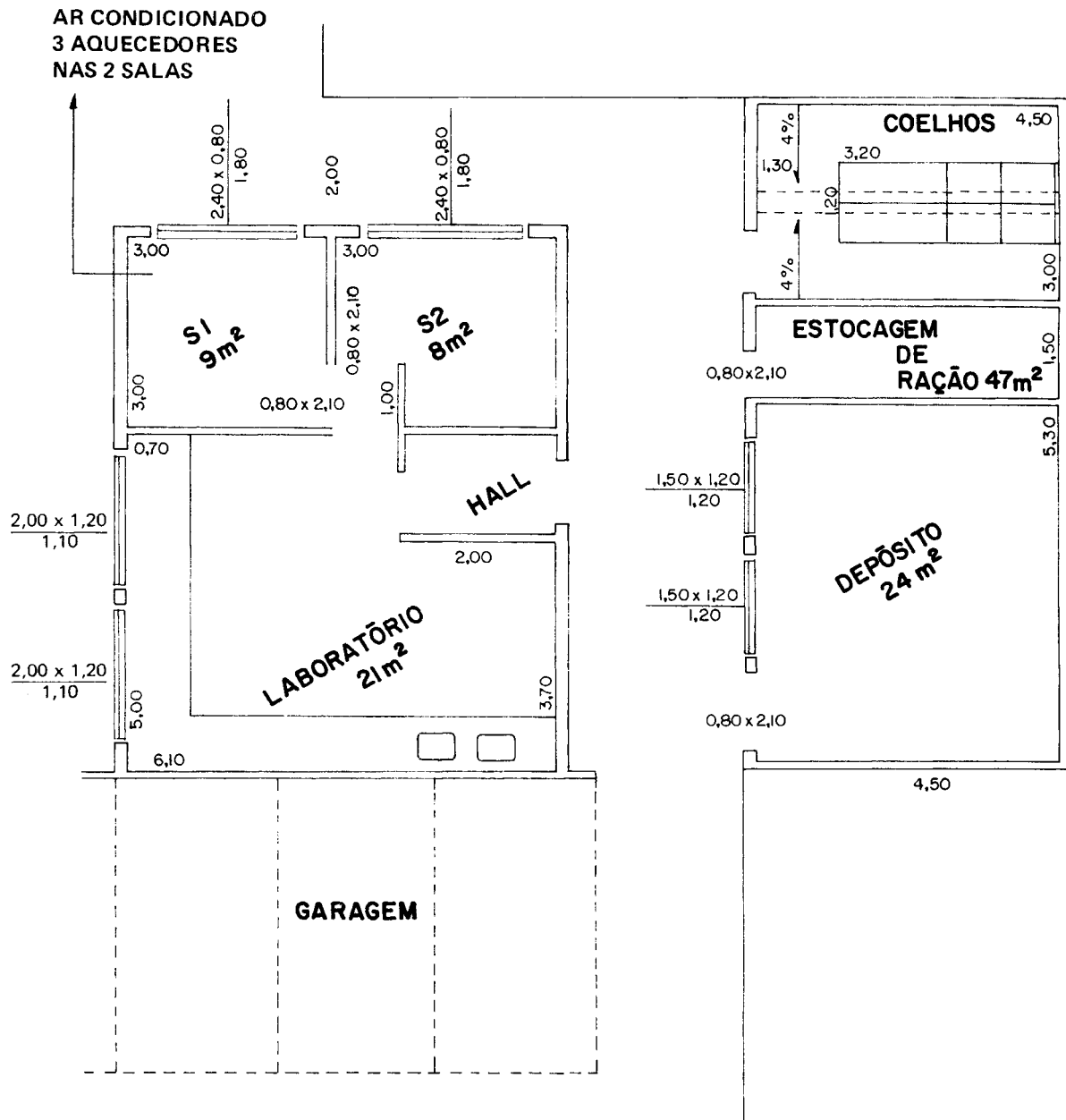
Coleta de alados e produção de ovos:

Fêmeas selvagens de *An. darlingi* são capturadas nos períodos crepusculares, no Município de Dourado, SP, distante 50 km do insetário, às margens do Rio Jacaré-Pepira. Os exemplares são coletados individualmente, com isca humana, em frascos de vidro vasados de 2x5 cm, com dedais de tela em ambas as extremidades (tubos Corrêa). As fêmeas são alimentadas com algodão embebido em solução de sacarose a 10% e transportadas ao laboratório, onde são identificadas colocando-se diretamente o tubo sob o microscópio.

Após a identificação são colocadas, em grupos de 10, em copos plásticos de 500 ml, telados, com fundo de algodão e papel filtro úmido para oviposição. O interior dos copos é lixado para permitir o repouso nas laterais.

As fêmeas são alimentadas diariamente, com sangue humano, diretamente no braço. Recentemente este tipo de alimentação vem sendo substituído por camundongos anestesiados e colocados diretamente sobre os copos.

Os ovos são coletados a cada dois dias, por lavagem do papel filtro nas bandejas de criação de larvas.



Criação de larvas:

As larvas são criadas em bandejas de plástico, circulares, com 25 cm de boca e 10 cm de altura. Essas bandejas, tipo bacia, são de baixo custo e facilitam a limpeza. A água é proveniente de fonte natural e permanece em galões plás-

ticos no interior da sala para equilíbrio da temperatura. A troca de água é feita diariamente pelo seguinte processo: despeja-se a água com as larvas em uma bandeja limpa; nesta, provoca-se um movimento circular na água com uma pera de borracha de bico longo para que o sedimento restante (alimento, exúvias e

larvas mortas) se acumule no centro do fundo da bandeja; aspira-se o resíduo e a água, pelo fundo, até reduzir o volume a uma lâmina de água; completa-se o volume com água limpa.

Para a alimentação utilizou-se uma mistura de partes iguais de farinha de milho, ração para aves de corte, ração para pássaros e fermento para biscoito de polvilho, moídos e peneirados. Complementa-se a alimentação com fermento Fleischmann. Após experimentos com diferentes rações, optou-se por aquela proposta por SANTOS¹⁰ que se constitui na mistura de uma parte de farinha de peixe para duas de pão torrado e moído e duas de germe de trigo. Não é utilizado qualquer tipo de levedura viva.

A ração é oferecida diariamente na quantidade aproximada de 0,3 a 0,6 mg/larva de acordo com o estágio larval predominante na bandeja, segundo o proposto por GERBERG⁸. O número médio de larvas por bandeja é de 200 exemplares.

A disposição seqüencial das bandejas em prateleiras permite visualizar a evolução das larvas pela distribuição dos diferentes estádios larvais em diferentes alturas da estante.

A coleta de pupas é feita diariamente pela aspiração individual com pipeta Pasteur. Estas pupas são contadas e colocadas para eclosão em frascos com tampa adaptada em "funil invertido". Isto impede a entrada de alados no frasco de pupas.

Manutenção de alados:

As gaiolas de alados medem, cada uma, 1 m de largura por 1 m de altura por 0,60 m de lado. A base e o teto são de madeira maciça suportados por sarrafos. As laterais e o fundo são feitos de tecido de algodão. A frente é de tela de nylon, malha 20, e apresenta duas aberturas protegidas por manga de malha de algodão: uma superior, pequena, e uma rente à base, com 0,30 m de boca. A abertura superior permite a manipulação de mosquitos e das fontes de alimentação não sanguínea. A abertura inferior permite a limpeza do fundo da gaiola e a colocação da fonte de alimentação sanguínea.

O primeiro alimento citado compõe-se de bolas de algodão embebidas em solução de sacarose a 10% e fatias de maçã ou beterrabas, penduradas no teto.

A alimentação sanguínea é feita sobre o dorso de coelhos com área depilada. Os coelhos

permanecem imobilizados em caixas de contenção. Esta caixa compõe-se de uma base de madeira em cuja extremidade existe uma cela com abertura em guilhotina, onde o animal fica preso pelo pescoço. Esta caixa visa protegê-lo de picadas no focinho e orelhas que são áreas muito sensíveis. A estrutura e medidas da caixa de contenção podem ser vistas na figura 2.

A alimentação sanguínea, em coelhos, é oferecida diariamente aos mosquitos por cerca de três horas.

Além das aberturas frontais existe uma outra, lateral, destinada à oviposição. A metade inferior de uma lateral não tem tecido e se estende na forma de túnel de filó até a boca de um cristalizador de vidro, de 30 cm de diâmetro por 30 cm de altura. Essa manga de filó é presa por sarrafos de madeira na gaiola e amarrada à boca do cristalizador. Este, com água até 2/3 de altura, permanece dentro de um aquário, com fundo escurecido. Este conjunto simula, para as fêmeas grávidas, um criadouro amplo e de grande profundidade.

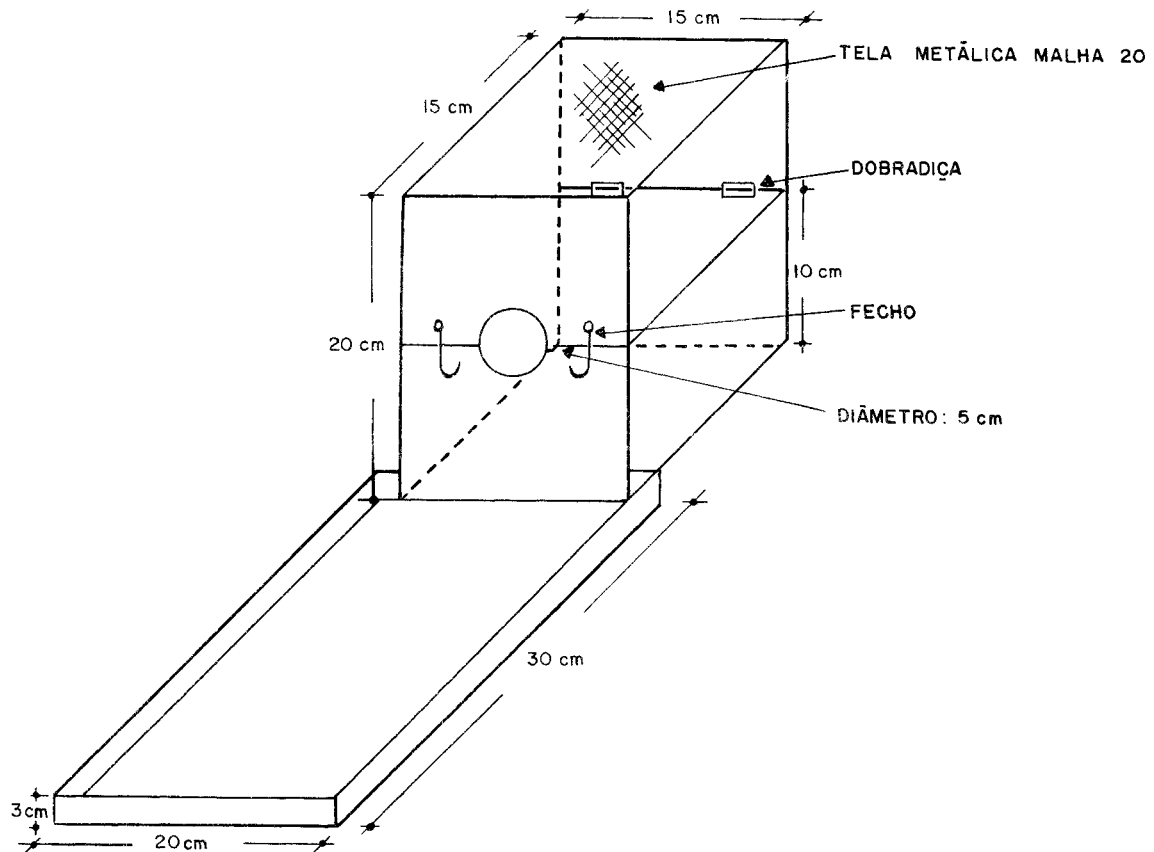
Diariamente, o cristalizador é descoberto e são coletados os ovos com tiras de papel filtro. Os ovos coletados são semeados em bandejas identificadas, as quais são levadas para a sala de criação de larvas.

O acompanhamento da população de alados na gaiola é feito pelo registro diário de três dados: n.º de pupas vivas que entram, n.º de pupas mortas retiradas e n.º de alados mortos. Estes últimos são coletados a partir da limpeza do fundo da gaiola, com o auxílio de um aspirador, e daqueles que morrem na superfície do cristalizador de oviposição.

Quanto às condições climáticas, procura-se manter a temperatura das salas entre 25 a 27°C e a umidade relativa do ar acima de 70%. O fotoperíodo é de aproximadamente 12 horas luz, 12 horas sombra. Durante o dia, a luminosidade mantém-se reduzida à penumbra, graças às telas escuras das janelas (sombrite) e persianas horizontais.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Na instalação desse insetário optou-se, como já foi dito, por iniciar a colônia partindo-se da metodologia desenvolvida por CORRÊA, mesmo que algumas técnicas já tivessem sido testadas com sucesso por outros autores. Estas seriam incorporadas paulatinamente. Ainda co-



mo opção de trabalho procurou-se desenvolver um insetário de produção em massa de mosquitos, sem privilegiar procedimentos que, embora fornecedores de dados sobre a biologia da espécie, viessem sobrecarregar o trabalho como, contagem de ovos e larvas nos diferentes estádios, determinação de taxas de eclosão, sobrevivência, etc. Estas observações deverão ser feitas em experimentos paralelos, utilizando-se grupos de insetos restritos.

Quanto a tentativa de repetição da experiência original verificou-se um fato já esperado, qual seja, os resultados obtidos por aquele autor, numa situação de colônia bem estabelecida, nem sempre são reprodutíveis no início da colônia, mesmo se mantendo rigorosamente as técnicas utilizadas. Isto se deve provavelmente ao "status" genético das populações seguramente com diferentes graus de adaptação às condições de laboratório.

Em vista disso observa-se que a colônia, nesse primeiro ano de existência, ainda apresenta grande dependência da introdução de ovos provenientes da população selvagem. A maior densidade de indivíduos acompanhou assim as variações sazonais da população natural, cujo ápice ocorre no período de maio a agosto.

O esquema de manutenção da colônia diferiu da de CORRÊA⁵ quando se procurou trabalhar com duas populações distintas. Para isso foram utilizadas duas gaiolas, uma das quais recebia apenas os adultos (F_1) nascidos da geração do campo (parental). Essa geração, portanto F_2 , era colocada em bandejas separadas e os alados resultantes eram colocados na segunda gaiola. Desta forma esperava-se contar com uma gaiola de F_1 , com introdução permanente de indivíduos selvagens, e outra, onde se teria uma população mais adaptada às condições de laboratório. Os ovos colhidos nessa segunda

TABELA 1

Produção de exemplares de *An. darlingi* (geração F₁) no período de junho a novembro de 1987.

Mês	Pupas (ent.)	Pupas Mortas	% Mortas	adultos Vivos (ent.)	♂♂	Adultos Mortos ♀♀	T
Jun	3.316	346	10.4	2.970	809	1.219	2.028
Jul	7.412	678	9.1	6.734	1.535	1.360	2.895
Ago	15.969	751	4.7	15.218	5.038	5.032	10.070
Set	15.012	1.306	8.7	13.706	5.646	5.006	10.652
Out	3.235	135	4.2	3.100	2.351	2.480	4.831
Nov	5.516	540	9.8	4.976	1.658	1.488	3.146
Total	50.460	3.756	7.4	46.704	17.037	16.585	33.622

TABELA 2

Produção de exemplares de *An. darlingi* (geração F₂) no período de junho a novembro de 1987.

Mês	Pupas (ent.)	Pupas Mortas	% Mortas	Adultos Vivos (ent.)	♂♂	Adultos Mortos ♀♀	T
Jun	—	—	—	—	—	—	—
Jul	5	—	—	5	—	—	—
Ago	112	9	8.0	103	36	68	104
Set	299	17	5.7	282	99	74	173
Out	977	30	3.1	947	397	419	816
Nov	78	3	3.8	75	77	92	169
Total	1.471	59	4.0	1.412	609	653	1.262

gaiola gerariam adultos que voltariam a integrar essa mesma população.

Esse esquema foi seguido nos seis primeiros meses de trabalho e não pode ser mantido devido a queda na população F₁. Conseqüentemente o número de indivíduos F₂ não foi suficiente para permitir cópula e oviposição. Os dados das tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos nesse período.

Como se verifica, as maiores densidades obtidas na gaiola de F₁ ocorreram nos meses de agosto e setembro como conseqüência do elevado número de ovos colhidos nos meses anteriores a partir de fêmeas do campo. Esse fato se repete em F₂ com maior produção em setembro e outubro.

Os dados apresentados nas tabelas acima devem ser vistos apenas como registro de produção, visto que não permitem concluir sobre taxas de mortalidade geral ou por sexo. Apenas chama-se a atenção para a elevada mortalidade de pupas. A causa principal é a contaminação

por fungos que crescem nos frascos onde as pupas são postas a eclodir dentro das gaiolas de alados. Esses fungos estão sendo estudados visando a adoção de substâncias inibidoras no meio sem prejuízo para os insetos. Até o momento sabe-se que ocorrem duas espécies filamentosas e uma levedura, que envolvem as pupas dificultando a sua mobilidade.

Quanto a mortalidade de adultos, embora não se disponha de avaliação da sobrevivência diária, deve-se registrar que periodicamente ocorrem grandes baixas na população. Acredita-se que isto ocorra em virtude de alterações bruscas na umidade relativa na sala de manutenção de alados.

A temperatura nesta sala tem sido mantida abaixo 27°C e a umidade relativa acima de 70%. Entretanto, tem-se registrado elevações de temperatura ao redor de 30°C, principalmente nos dias mais quentes, com difícil manutenção da umidade relativa elevada. Os aparelhos convencionais de correção dessas variáveis

tem-se mostrado ineficazes. O uso de ar condicionado mostrou-se totalmente inadequado.

Atualmente estão sendo feitas adaptações na estrutura do prédio visando maior isolamento térmico com o exterior.

Ainda com relação a manutenção de alados, pode-se dizer que a alimentação não sanguínea tem-se mostrado satisfatória. A introdução de beterraba, juntamente com maçãs e solução de sacarose, além de atrativa para os mosquitos, facilita a operação dada a sua maior resistência a dessecação e proliferação de microorganismos fermentadores.

O mesmo não se observa na alimentação sanguínea. A oferta de coelho não tem dado resultados tão satisfatórios como foram conseguidos por CORRÊA¹¹. A proporção de fêmeas engurgitadas é baixa, o que deve explicar a baixa produção de ovos. Esta fonte de repasto sanguíneo vem sendo substituída, com resultados promissores, por ratos brancos de laboratório. Os animais são anestesiados, colocados numa rede de filô e pendurados no teto da gaiola.

Quanto ao acasalamento pode-se dizer que é uma das principais barreiras a serem vencidas na colonização de *An. darlingi*⁸. O uso de gaiolas pequenas, que dão grande agilidade no manejo de espécies estenogâmicas não tem-se mostrado adequadas para a criação dessa espécie. A gaiola utilizada, com 1 m x 1 m x 0,6 m, mostrou que permite o vôo nupcial, com cópula, quando a população ultrapassa 2.500 exemplares. Quando a população de alados cai abaixo desse valor, a produção de ovos torna-se intermitente.

Dos resultados obtidos até o momento os mais consistentes referem-se a criação de larvas. Tanto na parte operacional (uso de bandejas, troca de água, etc) como no que diz respeito ao desenvolvimento larvário a colônia é satisfatória.

Em experimentos paralelos onde foram acompanhados grupos de 100 larvas mantidas individualmente, porém nas mesmas condições climáticas e de alimentação da colônia foi possível medir o tempo de desenvolvimento larvário bem como a mortalidade, pelo método de determinação do estadio mediano, como segue:

estadio	duração (dias)	mortalidade (%)
I	2,7	2,4
II	1,7	—
III	2,2	—

IV	4,5	1,03
V (pupa)	1,7	3,03
I-V	12,8	6,10

Ainda que estes dados se refiram a larvas mantidas isoladamente, portanto livres da competição existente nas bandejas, eles confirmam a observação diária onde se constata reduzida mortalidade de larvas.

A ração ora em uso mostrou vantagens sobre aquela utilizada por CORRÊA⁵ quanto ao tempo de desenvolvimento larvário. Quanto à mortalidade os dados são semelhantes. Ressalta-se ainda que essa ração dispensa a complementação alimentar com leveduras, com seus inconvenientes, e é feita a partir de produtos facilmente encontrados no mercado.

Em vista dessas considerações, várias adaptações estão sendo feitas na metodologia de manutenção da colônia, sempre numa perspectiva de simplificação tanto dos equipamentos quanto das técnicas utilizadas.

SUMMARY

Maintenance of *Anopheles darlingi*, Root, 1926, in laboratory

The authors describe the installation and the initial efforts to maintain *Anopheles darlingi* laboratory colonies in Araraquara — SP, as part of the Malaria Research Program — SUCEN.

Based on other investigators' suggestions and on their own experience in the first six months of work, the authors present some modifications to the original methods of insect rearing, described by CORRÊA in the 70's. The aim is to maintain insect colonies, using simple techniques and equipment.

Information on larval and adult feeding, duration of larval instars, insect mortality and mating are provided.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos técnicos Antenor Seisdedos, Luiz Zaia, João Mauricio N. da Silva, José Antonio Zuanon e José Carlos Gabarron.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRETO, M.P. & COUTINHO, J.O. — Criação de algumas espécies de anofelinos brasileiros. *Rev. bras. Biol.*, 3: 317-323, 1943.
2. BATES, M. — The laboratory colonization of *Anopheles darlingi*. *J. nat. Malar. Soc.*, 6: 155-158, 1947.
3. BERGO, E.S.; BURALLI, G.M.; PRADO, M.A.N.; ALMEIDA, M.G. & SANTOS, J.L.F. — Avaliação do desenvolvimento e do estado nutricional de *Anopheles darlingi* Root, 1926, criado em laboratório sob diferentes dietas. São Paulo, 1988. 12 p. (Projeto e relatório parcial apresentados à Comissão Científica Permanente da Superintendência de Controle de Endemias — SUCEN).
4. COLUZZI, M. — Maintenance of laboratory Colonies of *Anopheles* mosquitoes. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 31: 441-443, 1964.
5. CORRÊA, R.R.; FERREIRA, E.; RAMALHO, G.R. & ZAIA, L. — Informe sobre uma colônia de *Anopheles darlingi* — São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENE, 18., São Paulo, 1970. p. 80, res. n.º 107.
6. FORATTINI, O.P. — *Entomologia médica*. São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. v. 1.
7. FREIRE, S.A. & FARIA, G.S. — Criação e alguns dados sobre a biologia do *Anopheles darlingi*. *Rev. bras. Biol.* 7: 57-66, 1947.
8. GERBERG, E.J. — Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *Amer. Mosq. Control Ass. Bull.*, (5): 1-109, 1970.
9. GIGLIOLI, G. — Laboratory colony of *Anopheles darlingi*. *J. nat. Malar. Soc.*, 6: 159-164, 1947.
10. SANTOS, J.M.; CONTEL, E.P.B. & KERR, W.E. — Biologia de anofelinos amazônicos. 1 — ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi*, Root, 1926 (Diptera: culicidae) da Rodovia Manaus — Boa Vista. *Acta amaz. (Manaus)*, 11: 789-797, 1981.
11. SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN). Relatório: Atividades de entomologia desenvolvidas em Araraquara. São Paulo, 1979.