



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 INSTITUTO DE BIOLOGIA
 DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA



**ESTUDOS DE CAMPO E DE LABORATÓRIO SOBRE O PARASITISMO POR
 MICROSPORÍDEOS E MERMITÍDEOS EM POPULAÇÕES LARVAIS DE
 SIMULÍDEOS.**

Carmen María Ambrós Ginarte

Feste exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Carmen María Ambrós Ginarte e aprovada pela Comissão Julgadora [assinatura] 22/10/98

**Dissertação apresentada ao Instituto de
 Biologia da Universidade Estadual de
 Campinas para a obtenção do título de
 Mestre em Ciências Biológicas,
 Área de Parasitologia**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Salgueroisa de Andrade

Campinas/SP

1998

5817831



UNIDADE	BC
1.ª CHAMADA:	UNICAMP
	Am18e
	ET
FAVOR DE:	34 867
PROB:	395/98
	<input type="checkbox"/>
VALOR:	R\$ 11,00
DATA:	28/08/98
N.º OPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00116070-0

Am18e

Ambrós Ginarte, Carmen María

Estudos de campo e de laboratório sobre o parasitismo por microsporídeos e mermitídeos em populações larvais de simulídeos / Carmen María Ambrós Ginarte. -- Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Carlos Fernando S. de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Simulídeo. 2. Parasitismo. 3. Mermitídeo.
4. Microsporídia. I. Andrade, Carlos Fernando S. de.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 22 de julho de 1998

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

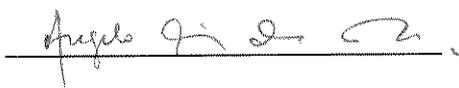
Prof. Dr. CARLOS FERNANDO SALGUEROISA DE ANDRADE



Assinatura

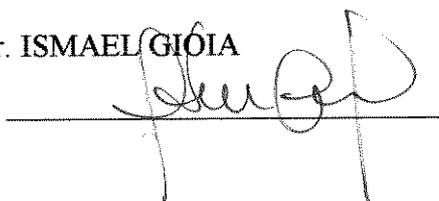
(Orientador)

Prof. Dr. ANGELO PIRES DO PRADO



Assinatura

Prof. Dr. ISMAEL GIOIA



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. ARMANDO CASTELLO BRANCO JR.



Assinatura

AGRADECIMENTOS.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando S. de Andrade, pela orientação deste trabalho, apoio e amizade sempre oferecidos.

À Fundação M. Brown e à CAPES pelo apoio financeiro durante o primeiro e segundo ano do curso, respetivamente.

Ao Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Cuba, em especial ao Departamento Control de Vectores pelo apoio durante este período.

Ao Prof. Dr. Sixto Coscarón, do Museo de Historia Natural de la Universidad de la Plata, Argentina, pela confirmação das espécies de simulídeos identificadas.

Aos professores e funcionários dos Departamentos de Parasitologia e Zoologia, pela ajuda e conhecimentos brindados ao longo do curso.

Aos professores Dra. Regina Maura Bueno Franco e Dr. Nelson da Silva Cordeiro do Departamento de Parasitologia, IB/UNICAMP, pelo auxílio nas técnicas de coloração de microsporídeos.

Aos professores Dr. Angelo Pires do Prado, Dr. Odair Benedito Ribeiro, Dra. Marlene Tiduko Ueta, Dra. Prafulbala N. Patel e Dr. Ismael Gioia pelas análises prévias do trabalho em suas versões para qualificação e pré-banca e pelas importantes sugestões que ajudaram a melhorar o trabalho.

Aos técnicos Gilcia A. de Carvalho Silva do Departamento de Zoologia e Nilson Branco do Departamento de Parasitologia, pelo auxílio técnico durante a realização do trabalho.

Aos colegas do Departamento de Zoologia, Luciana, Rejani, Giovana, Virginia, Sergio e em especial ao Jairo pela ajuda na realização das coletas no campo e valiosas contribuições e auxílios prestados.

Ao Lorenzo, pela ajuda na revisão do idioma português.

Ao Paulo, Rosabel, René e o Vicente pela amizade incondicional e ajuda oferecidas.

Ao Rigoberto pelo apoio, estímulo e compreensão durante esta etapa.

A meus pais, pelo carinho e incentivo durante toda minha vida.

À todas as pessoas que contribuíram à realização deste trabalho.

RESUMO.

Foi realizado um levantamento de larvas de simúlídeos em localidades dos estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Minas Gerais, durante o período de fevereiro de 1996 a maio de 1998. Após a análise das larvas de simúlídeos coletadas em cada localidade, encontrou-se parasitismo por *Polydispyrenia simulii* (Microspora: Duboscquiidae) nas localidades de Morungaba/SP (24,06% na rampa de cimento à jusante do lago e 1,32% no leito de um riacho) e no leito de riacho em Leme/SP (5,68%). Outras microsporidioses foram observadas nas localidades da Serra do Japi/SP, onde a prevalência foi muito baixa durante o período de estudo; além de Barra do Una/SP; Paulínia/SP; Sorocaba/SP; Tibají/PR; Rolândia/PR; São Francisco de Paula/RS; Barão/RS; Santo Antônio de Atalanta/SC e em Itapema/SC.

Além do parasitismo por microsporídeos, encontrou-se também parasitismo por *Isomermis* sp. (Nematoda: Mermithidae) em larvas de simúlídeos na Serra do Japi/SP, onde a prevalência dessa parasitose variou no mínimo de 1,28% a máximo de 21,30% na rampa de cimento à jusante do lago e no mínimo de 0,86% a máximo de 20% no leito do mesmo riacho; observando-se as maiores ocorrências no mês de maio de 1996 (na rampa) e em setembro de 1997 (no leito do riacho) que correspondem aos meses início e fim do inverno, diminuindo grandemente durante os meses de verão, período em que há um aumento nas temperaturas e precipitações. Se mostra também como variou a densidade larval relativa de simúlídeos durante este período, nesta localidade e é correlacionada com a ocorrência de parasitismo. Parasitismo por outros mermitídeos foram encontrados também em larvas de diferentes espécies de simúlídeos das localidades de Morungaba/SP, Leme/SP, Barra do Una/SP, Sorocaba/SP, Tibají/PR, Rolândia/PR, São Francisco de Paula/RS, Barão/RS, Santo Antônio de Atalanta/SC e Montes Verdes/MG

Na localidade de Ilhabela/SP registra-se pela primeira vez parasitismo pelo fungo *Coelomycidium* sp. em larvas de *Simulium (Chirostilbia) pertinax*, localidade esta submetida durante vários anos ao controle químico e agora recebe controle biológico com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sorotipo H-14. Nenhuma parasitose foi observada nas

localidades: Chapada dos Guimarães/MT, Florianópolis/SC e nas localidades estudadas no município de Campinas/SP.

No laboratório, determinou-se para *Isomermis* sp., que após dez dias da emergência do nematódeo da larva hospedeira, os pós-parasitas mudam para adultos em um meio de água destilada à uma temperatura entre 22 e 24 °C.

Areia úmida, colocada em um recipiente fechado e mantido a uma temperatura de 17 °C é eficaz para a criação das formas de vida livre de *Isomermis* sp. no laboratório; e parece ser a sexta semana após a colocação dos pós-parasitas na cultura de areia úmida, a mais indicada para a inundação da cultura e obtenção da maior quantidade de larvas infectivas ou preparasíticas.

As tentativas feitas para avaliar *Isomermis* sp. em hospedeiros alternativos no laboratório foram infrutíferas, indicando que este mermitídeo parece ser um parasita específico de larvas de simulídeos.

ABSTRACT.

A survey of parasites in simuliid larvae was carried out in different localities in the states of São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Minas Gerais, from February 1996 to May 1998. Examination of the larvae collected from the above mentioned localities revealed parasitism by *Polydispyrenia simulii* (Microspora: Dubosquiidae) in Morungaba/SP (24.06% in larvae from a cemented ramp in the lake outlet, and 1.32% in larvae from the stream bed) and from Leme/SP, collected from the stream bed. Microsporidiosis caused by other species was also found in Serra do Japi/SP, Barra do Una/SP, Paulínia/SP, Sorocaba/SP, Tibaji/PR, São Francisco de Paula/RS, Barão/RS, Santo Antonio de Atalanta/SC and Itapema/SC, the occurrence being very low in Serra do Japi during the survey period.

Beside microsporidian, parasitism by *Isomermis* sp. (Nematoda: Mermithidae) was also found in simuliid larvae collected from Serra do Japi/SP. The occurrence of this parasite ranged from 1.28% to 21.30% in larvae collected from the cemented ramp in the lake outlet, and from 0.86% to 20% in larvae collected from the stream bed. The higher occurrence of *Isomermis* sp. in the above mentioned sites, was probably related to the winter season, during the months of May 1996 and September 1997. It was low during the summer months, period of high temperatures and rain fall. Also relative variation in larval density is shown for the simuliid species found in Serra do Japi/SP and is correlated to the occurrence of parasitism. Parasitism by other mermitids species was also found in larvae of different simuliid species in the localities of Morungaba/SP, Leme/SP, Barra do Una/SP, Sorocaba/SP, Tibaji/PR, Rolândia/PR, São Francisco de Paula/RS, Barão/RS, Santo Antonio de Atalanta/SC and Montes Verdes/MG.

We also observed micoses caused by *Coelomycidium* sp. in the larvae of *Simulium*. (*Chirostilbia*) *pertinax* in Ilhabela/SP. This is the first record in the literatura about *Coelomycidium* sp. attacking larvae of *S. (Ch.) pertinax* in Ilhabela, the refered locality was subjected to simuliid chemical control for many years but recently a biological control program using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 is being undertaken. Parasitism was not found in simuliid larvae collected from the localities in Campinas/SP, Chapada dos Guimarães/MT and Florianópolis/SC.

We observed that *Isomermis* sp. requires approximately 10 day after the post emergence from the simuliid host to transform into adult in distilled water, at 22 to 24°C.

The free stage of the nematode *Isomermis* sp. was successfully breed under laboratory conditions in a closed vial with wet sand and kept at 17°C. It can be suggested that the sixth week after introducing the post-parasites in wet sand is more appropriate in order to inundate the culture to obtain a large number of pre-parasitic infective worms.

Attempts to evaluate the infection caused by of *Isomermis* sp. in alternative hosts under laboratory conditions were unsuccessfull, indicating a possible specificity of the parasite to simuliid host.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos Gerais.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Os simulídeos.....	3
2.1.1 Importância médica, veterinária e socioeconômica.....	4
2.1.2. Controle.....	7
2.2. Nematódeos parasitas da família Mermithidae.....	12
2.2.1. Posição taxonômica.....	12
2.2.2. Ciclo de vida.....	13
2.2.3. Mermitídeos parasitas de simulídeos e sua distribuição geográfica.....	14
2.2.4. Patogenicidade dos mermitídeos.....	16
2.3. Protozoários microsporídeos parasitas de simulídeos.....	17
2.3.1. Posição taxonômica e distribuição geográfica.....	17
2.3.2. Ciclo de vida de <i>Microspora</i>	18
2.3.3. Patogenicidade dos microsporídeos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Coleta do material no campo.....	20
3.2. Avaliação do parasitismo no laboratório.....	22
3.3. Procedimentos para a identificação das espécies parasitas e hospedeiras.....	23
3.4. Criação das formas de vida livre de <i>Isomermis</i> sp. no laboratório.....	24
3.5. Observação do processo de muda das formas pós-parasitas de <i>Isomermis</i> sp. no laboratório.....	24
3.6. Criação de hospedeiros alternativos.....	24
3.7. Avaliação no laboratório de <i>Isomermis</i> sp. em hospedeiros alternativos.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Levantamento de larvas de simulídeos parasitadas.....	27
4.1.1. Parasitismo por microsporídeos.....	32
4.1.2. Parasitismo por nematódeos mermitídeos.....	37

4.2. Prevalência do nematódeo mermitídeo <i>Isomermis</i> sp. e de protozoários microsporídeos em larvas de simulídeos na Serra do Japi.....	42
4.3. Variação da densidade larval relativa das espécies de simulídeo no leito natural do riacho e na rampa da Serra do Japi.....	50
4.4. Criação das formas de vida livre de <i>Isomermis</i> sp. no laboratório.....	53
4.5. Observação do processo de muda das formas pós-parasitas de <i>Isomermis</i> sp. no laboratório.....	55
4.6. Criação de hospedeiros alternativos.....	56
4.7. Avaliação de <i>Isomermis</i> sp. em hospedeiros alternativos.....	57
5. CONCLUSÕES.....	59
6. LITERATURA CITADA.....	61
7. ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO.

Os simulídeos são insetos que pertencem ao ordem Diptera, subordem Nematocera, família Simuliidae, comumente conhecidos como “blackflies” e “buffalo gnats” na Europa e América do Norte, “moscas alazanes”, moscas do café e “jejenes” na América Tropical. No Brasil, são conhecidos por borrachudos no centro, sul e sudeste do país e por piuns no norte e nordeste. Estes dípteros encontram-se distribuídos no mundo todo, exceto na Antártica e em algumas ilhas que não tem água corrente. O primeiro registro fóssil data do período Jurássico médio (a aproximadamente 160 milhões de anos). Até fim dos anos oitenta, 1554 espécies haviam sido descritas (Crosskey, 1990), pertencentes a duas subfamílias: Parasimuliinae, restrita à região Neártica e Simuliinae, que é cosmopolita.

A hematofagia que as fêmeas de muitas espécies de simulídeos exercem os coloca na categoria de insetos daninhos em muitas regiões do mundo. Sua importância sanitária está no fato de serem causadores de moléstias pelas picadas que produzem e por serem vetores de doenças ao homem e animais domésticos.

Na região neotropical, das 335 espécies registradas (84 de Prosimuliini e 251 de Simuliini), 73 são hematófagas. Destas, três pertencem à tribo Prosimuliini, as restantes correspondem a tribo Simuliini, gênero *Simulium*. São características por sua marcada antropofilia todas as espécies dos subgêneros *S. (Notolepria)*, *S. (Cerqueirellum)* e uma grande maioria de *S. (Psilopelmia)*. Outros subgêneros como *S. (Chirostilbia)*, *S. (Simulium s. str.)*, *S. (Ectemnaspis)* e *S. (Grenierella)*, apresentam algumas espécies com marcada hematofagia. As espécies dos subgêneros restantes apresentam escassa antropofilia (Coscarón, 1989).

O surgimento e uso dos inseticidas químicos constituiu um arma muito eficaz para combater estes vetores, mas a resistência manifestada, a contaminação provocada ao meio por suas aplicações excessivas e o elevado custo das substâncias químicas, levou à adoção de outros métodos de luta antivetorial, entre estes encontram-se a luta biológica, a qual baseia-se na utilização de organismos (parasitas, predadores ou patógenos) para o

controle das populações de outros organismos, como pragas da agricultura ou vetores de doenças humanas.

A busca de novas opções, especialmente voltadas aos agentes de controle biológico, vem revelando uma série de agentes que precisam ser estudados com maior profundidade. Entre estes encontram-se principalmente os nematódeos mermitídeos, os protozoários microsporídeos e os fungos.

Na região neotropical alguns estudos tem sido feitos em relação à procura por inimigos naturais de simulídeos (Marino *et al.*, 1979; Garcia *et al.*, 1989; Camino, 1991; Torres *et al.*, 1991), mas estes não têm ainda permitido sua utilização como elementos de luta biológica para o controle. No Brasil, têm sido feitos poucos estudos a respeito e a maioria encontra-se em forma de teses ou resumos de congressos.

1.1. Objetivos Gerais.

Tendo em consideração o escasso número de trabalhos existentes no Brasil em relação a inimigos naturais parasitas de simulídeos e a importância destes no controle natural de populações destes dípteros, assim como a necessidade de avaliar estes parasitas como possíveis agentes de controle biológico e sua inclusão nos programas de controle integrado de borrachudos o presente estudo teve os seguintes objetivos:

- Levantamento de larvas de simulídeos parasitadas, em cursos de água de diferentes localidades dos estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais.
- Estudo da prevalência de *Isomermis sp.* (Nematoda: Mermithidae) e *Microspora* em larvas de simulídeos na Serra do Japi/SP.
- Estabelecimento de uma metodologia para a criação das formas de vida livre de *Isomermis sp.* no laboratório.
- Avaliação do ataque de *Isomermis sp.* em possíveis hospedeiros alternativos visando a manutenção da fase parasita deste mermitídeo no laboratório, tendo em consideração a dificuldade de criação de seu hospedeiro natural, Simuliidae, em condições de laboratório.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Os simulídeos.

Os simulídeos são pequenos dípteros de aspecto corcunda. Seu ciclo de vida compreende quatro estágios, ovo, larva e pupa que se desenvolvem na água corrente e adulto de ambientes aéreo e terrestre. O número de estádios larvais varia entre sete e nove para diferentes espécies e a duração dos estágios de vida varia com o clima e geograficamente (Crosskey, 1990).

Acredita-se que as fêmeas de simulídeos copulam só uma vez em seu tempo de vida e fertilizam todos seus ovos, produzindo várias posturas. Espécies autógenas são capazes de desenvolver posturas sem necessidade de exercer a hematofagia, enquanto espécies anautógenas precisam da realização do repasto sanguíneo para o desenvolvimento dos ovos. O número de ovos por postura varia de espécie para espécie, sendo a média entre 418 e 518 para *Simulium damnosum* (Crosskey, 1990) e de 237 para *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Pegoraro, 1993).

Esse grupo de dípteros se cria unicamente em água corrente (ambientes lóticos) e os ovos ficam aderidos a superfícies sólidas submersas ou livres em sedimentos do fundo; as larvas e pupas permanecem em geral aderidas a objetos inertes ou à vegetação (Crosskey, 1990). A capacidade de dispersão dos adultos pode ser muito grande, sendo relatadas por Garms & Walsh (1987) capacidades de vôo extremas, como superiores a 500 Km.

Muitas espécies que compõem esta família formam complexos integrados por espécies cripticas e morfologicamente indistinguíveis, como os complexos de vetores *Simulium damnosum* e *Simulium neavei* na África e *Simulium exiguum* Roubaud, 1906, *Simulium metallicum* Bellardi, 1859, *Simulium ochraceum* Walker, 1851 e *Simulium oyapockense* Floch & Abonnenc, 1946 na América Latina (Procnier, 1983).

2.1.1. Importância médica, veterinária e socioeconômica.

A importância médica dos borrachudos está em primeiro lugar no fato de serem vetores da Oncocercose ou cegueira dos rios, uma doença parasitária causada pelo nematódeo filarídeo *Onchocerca volvulus* Leuckart, 1823 que ocorre na África e na América Latina Tropical. A oncocercose atinge cerca de 85 milhões de pessoas no mundo, das quais pouco mais de 300 000 tornaram-se cegas. Em vista disso, essa doença é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das mais graves endemias. Sua distribuição cobre desde o Senegal e a Etiópia na África, até o sul do Yemén e parte de Arábia Saudita. Na América Latina encontra-se no México, Guatemala, Colômbia, Equador, Venezuela e Brasil, onde afeta aos índios Yanomami e as pessoas que vivem nas terras altas de Parima (OMS, 1991).

Na África a oncocercose é transmitida principalmente por espécies do complexo *S. damnosum*, embora na África oriental e central várias espécies do complexo *S. neavei* transmitam também a doença. Uma das zonas endêmicas mais extensas encontra-se na bacia do rio Volta na África ocidental, que abarca o Alto Volta e parte de Benin, Ghana, Costa de Marfil, Mali, Níger e Togo. Nesta zona realiza-se o Programa de Luta contra a oncocercoses, orientado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1976; Hougard, 1998).

Na América a oncocercoses foi descoberta em 1915 na Guatemala por Rodolfo Robles. Este autor descreveu o parasita e traçou o quadro clínico assinalando pela primeira vez as lesões oculares e incriminou *S. metallicum* e *S. ochracium* como os vetores (Ramírez-Pérez, 1985).

Na Guatemala e no México vários autores afirmaram que as três espécies vetoras em ordem de importância são, *Simulium ochracium* Walker, 1851, *S. metallicum* e *Simulium callidum* Dyar & Shannon, 1927. Considera-se que em determinadas condições, *Simulium gonzalezi* Vargas & Díaz Nájera, 1953, *Simulium veracruzatum* Vargas, Martínez Palacios & Díaz Nájera, 1946 e *Simulium haematopotum* Malloch, 1914 podem ser vetoras. Na Venezuela, *S. metallicum* é o principal vetor e considera-se que *S. exiguum* é um vetor secundário no foco do norte. No foco do sudeste da Amazônia

venezuelana, *S. oyapokense* é o vetor principal nas áreas baixas e *Simulium guianense* Wise, 1911 e *Simulium limbatum* Knab, 1915 são os vetores nas áreas altas. Na Colômbia e no Equador acha-se que o vetor é *S. exiguum*, espécie principalmente zoofílica que pode se tornar antropofílica na ausência de gado bovino e de cavalos, enquanto que *Simulium quadrivittatum* Loew, 1862 é o vetor secundário (OMS, 1976).

No Brasil, a oncocercose foi registrada pela primeira vez em 1967 na Amazônia. A doença é hiperendêmica em vilas isoladas na região fronteira das montanhas de Parima e nas terras baixas da bacia do rio Toototobi. Nesta última *S. oyapokense* é o vetor primário, *S. guianense* é o vetor secundário e suspeita-se de que *S. exiguum* seja vetor secundário. Nas áreas montanhosas, *S. guianense* e *S. limbatum* são vetores suspeitos por serem as principais espécies antropofílicas presentes e porque as microfilárias se desenvolvem na musculatura torácica dessas espécies em larvas L₁ (Shelley *et al.*, 1987).

Os borrachudos no Novo Mundo também são transmissores da mansonelose, filariose produzida por *Mansonella ozzardi* Manson, 1897. Sua patogenicidade é discutida por muitos autores (Rey, 1991).

Além dessas duas filarioses os simulídeos são vinculados à transmissão de encefalites eqüina (Trapido *et al.*, 1971), do sarcoma de Kaposi (Crosskey, 1990), do pênfigo foliáceo brasileiro (Pettit, 1987), e da síndrome hemorrágica de Altamira (Pinheiro *et al.*, 1974).

Os borrachudos além de serem vetores de doenças ao homem, são responsáveis pela transmissão de doenças aos animais. Temos por exemplo a Leucocitoozonose, uma doença fatal que atinge aves (perus, patos, gansos, frangos) e é causada por protozoários parasitas do sangue, do gênero *Leucocytozoon*. Também são vetores da oncocercose no gado, doença usualmente não patogênica causada por várias espécies do gênero *Onchocerca*. Sabe-se ainda que os borrachudos atuam como vetores mecânicos da mixomatose em coelhos (Crosskey, 1990).

Quanto às espécies de simulídeos não vetoras temos que sua importância deve-se ao transtorno que causam ao homem e animais domésticos devido a suas picadas. O aparelho bucal das fêmeas perfura a pele até cortar alguns capilares, formando-se uma pequena poça de sangue na qual a fêmea se alimenta. A saliva liberada no ato da picada contém substâncias anticoagulantes e anestésicas. A sensibilidade às substâncias da saliva

do borrachudo é que causa os diferentes graus de irritação nas pessoas ou animais de criação.

Algumas espécies de borrachudos induzem reações severas em indivíduos sensíveis; os borrachudos que picam geralmente nas extremidades podem causar edema generalizado das pernas, enquanto os que picam no rosto podem causar inchaço dos olhos acarretando em cegueira temporária (Crosskey, 1990).

Um grande número de picadas no mesmo homem podem causar a síndrome conhecida no estado de Nova York e na América do Norte em geral como “febre dos simulídeos”, onde espécies do complexo *S. venustum* são o principal agente. A sintomatologia característica é dor de cabeça, náusea, fadiga e depressão fisiológica. Essa mesma síndrome tem sido observada em pessoas atacadas por *S. aokii* no Japão e na Europa é provocado por *S. erythrocephalum* (Crosskey, 1990). O impacto econômico pode ser considerável devido às faltas das pessoas ao trabalho, tratamentos médicos extensos e em alguns casos hospitalização.

Espécies do complexo *S. venustum* no Canadá tem causado graves conseqüências econômicas para a indústria do papel, devido ao “stress” físico e psicológico causado pelo ataque constante desta praga, provocando baixa eficiência e produtividade (Crosskey, 1990).

Na Nova Zelândia duas espécies de simulídeos: *Austrosimulium australense* e *A. unguatum* são extremadamente antropofílicas, causando prejuízo ao turismo (Crosskey, 1990).

Ataques severos ao gado na Austrália e Canadá causam, grandes perdas econômicas. A produção de leite, o peso dos animais e o potencial reprodutivo podem ser grandemente afetados por causa do abandono das áreas de pastoreio pelo gado. O ataque também pode trazer como conseqüência inflamação no escroto (Ryan & Hilchie, 1982).

Na América do Sul na região da Amazônia, Humboldt e Bates descreveram suas experiências com esses dípteros em viagem pelo Orenoco e Amazonas. Eles assinalaram que suas pernas ficaram de tamanho enorme e os furos se agravavam em úlceras disseminadas. Os responsáveis por isto foram os membros do grupo *S. amazonicum* (Crosskey, 1990).

No sul e sudeste do Brasil uma das espécies mais antropofílicas é *S. pertinax* Kollar, 1832, causando elevadas taxas de ataque aos humanos. Existem registros, embora não publicados, de 400 borrachudos/hora/homem (BHH) quando da construção da usina nuclear de Angra dos Reis/RJ (comunicação pessoal, Dr. Sebastião José de Oliveira, Entomologia, Fiocruz); valores de 1500 BHH às margens do Ribeirão da Toca, Ilhabela/SP (comunicação pessoal Dr. Carlos Fernando de Andrade, IB, UNICAMP); e valores de 250 BHH em Joinville (comunicação pessoal, Dr. Dieter Klostermann, Fund. 25 de Julho). Por tais motivos tem-se levado a cabo programas de controle nestas regiões, com o objetivo de preservar o turismo (principalmente litoral do Rio de Janeiro e São Paulo) e as populações envolvidas com a produção agropecuária (principalmente Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

2.1.2. Controle.

As principais campanhas para o controle de simuliídeos tem sido diretamente contra as larvas, as quais estão confinadas a um habitat altamente restrito e relativamente fácil de tratar, água corrente. O controle de simuliídeos adultos, embora efetivo em áreas limitadas e para um propósito específico é muito custoso para seu uso em geral e bem menos específico.

Os primeiros métodos mecânicos propostos e testados para o controle de simuliídeos foram muito caros como é o caso da escovação das larvas dos criadouros e remoção da vegetação. Os primeiros métodos químicos foram ineficazes e envolviam a aplicação de substâncias altamente daninhas para a fauna não alvo, como por exemplo, a aplicação de emulsões de óleo, xilol, querosene ou arseniatos (Jamnback, 1981).

Fairchild & Barreda (1945) realizaram o primeiro registro testificando a eficácia do DDT contra simuliídeos na Guatemala. Posteriormente, Garnham & McMahon (1947) por sua parte eliminaram *S. neavei*, vetor da oncocercose na área de Koderia em Kenia, sul da África. Essas demonstrações da eficácia do DDT no controle de borrachudos levou a realização de um grande número de trabalhos no mundo todo, especialmente em Alasca, Canadá, USA, Uganda, Gana e Nigéria (Jamnback, 1981).

Investigações que começaram na década do 50 foram concentradas na busca de substitutos para o DDT, e levou a produtos menos daninhos para a fauna não alvo e efetivos para o controle de simuliídeos.

Dois dos substitutos mais efetivos foram o temefós (Abate[®]) (organo-fosforado) e o metoxiclor (organo-clorado), inseticidas que tem sido testados por vários autores contra larvas de simuliídeos (Dejoux, 1978, Escaffé *et al.*, 1976, Fredeen, 1975, Wallace *et al.*, 1976 *apud* Jamnback, 1981).

No Programa de Controle da Oncocercose (PCO) no oeste africano foram realizadas diferentes pesquisas utilizando várias formulações de inseticidas, decidindo-se inicialmente que um concentrado emulsionável de temefós (Abate[®]) era efetivo para eliminar larvas de *S. damnosum*, vetor da oncocercose nessa área (Walsh *et al.*, 1981), além de ser de baixa toxicidade para peixes, relativamente inócuo para a fauna de invertebrados não alvo e ser rapidamente biodegradável (Laws *et al.*, 1968). O uso deste inseticida durante vários anos trouxe como consequência o desenvolvimento de resistência, que levou os pesquisadores a buscar possíveis alternativas para o controle desses dípteros, incluindo outros larvicidas e formulações de reguladores do crescimento de insetos e agentes de controle biológico (Lacey & Mulla, 1977; 1978; Tompson & Adams, 1979; Undeen & Nagel, 1978).

Outros inseticidas químicos têm sido utilizados para o controle de borrachudos. Temos por exemplo o inseticida organofosforado Clorpirifós (Dursban[®]) que tem sido considerado entre mediana (Jamnback & Fempong-Boadu, 1966) e altamente efetivo (Travis & Schuchman, 1968) contra larvas de simuliídeos. O Carbaril (Sevin[®]) é um inseticida carbamato eficiente quando em doses altas (Jamnback, 1973); mas tem efeito prolongado e adverso para a fauna não alvo (Andrade, 1989). O Fenitrothion (Sumithion[®] ou Accorthion[®]) foi um inseticida fosforado muito utilizado em programas de controle de borrachudos no Japão (Jamnback, 1973).

A melhor opção de larvicidas para o controle químico que se tem atualmente, está no uso dos chamados Reguladores de Crescimento, principalmente aqueles à base de Benzoilfeniluréia. Atuam nas larvas, via oral, inibindo passos da síntese de quitina. Quando

estas passam pela ecdise, não conseguem consolidar a nova cutícula, e morrem pelos distúrbios fisiológicos decorrentes (Andrade, 1989).

Dentre os agentes biológicos, a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) (BTI) é a mais utilizada até o momento (Gaugler & Finney, 1982; Lacey & Mulla, 1977; Andrade & Castello Branco, 1991). Tem sido demonstrado por vários autores que não causa danos a fauna não alvo (Dejoux, 1979; Garcia *et al.*, 1981; Molloy & Jamnback, 1981; Hougard, 1998).

Embora muitas formulações contenham esporos vivos da bactéria, a atividade larvicida é devida às inclusões de proteínas parasporais que são produzidas durante a esporulação. As inclusões podem ser ingeridas e subseqüentemente solubilizadas no intestino médio alcalino para então serem ativas. Depois da ativação, a porção tóxica interfere com o balanço osmótico normal das células do ceco gástrico e intestino médio, resultando na lise e eventual necrose das células (Lacey & Federici, 1979; Federici, 1982). A larva morre como resultado dos distúrbios do intestino médio, sem septicemia, sem substancial multiplicação bacterial, ou amplificação de toxinas.

Sob condições de laboratório vários fatores foram mostrando a influência da atividade larvicida de *B. thuringiensis* (H-14) contra simulídeos (Lacey *et al.*, 1978; Gaugler & Molloy, 1980; Molloy *et al.*, 1981). Os mais notáveis foram: espécies de simulídeos, idade larval, temperatura da água, formulação, e inibição alimentar. Além desses fatores, a duração da aplicação, velocidade da corrente, vegetação marginal, descarga e poluição influenciam a atividade e efetividade sob condições naturais (Undeen & Colbo, 1980; Undeen *et al.*, 1981; Gaugler *et al.*, 1983; Lacey & Undeen, 1984).

O BTI tem sido utilizado em grande escala no Programa de Controle da Oncocercose (PCO) no oeste africano, indicando que é altamente efetivo contra larvas de *S. damnosum* s.l. (Undeen & Berl, 1979; Hougard, 1998).

Além do controle biológico de borrachudos com BTI que é industrializado em países como os Estados Unidos (ABBOTT, ZENECA) e Cuba (LABIOFAM) e comercializado no mundo todo; existem na natureza uma série de agentes que exercem um controle natural sobre as populações de borrachudos. Contra os simulídeos salientam-se os nematódeos mermitídeos e os protozoários microsporídeos, dos quais mais adiante

falaremos com maior profundidade; os protozoários flagelados dos gêneros *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas*, que se encontram geralmente no intestino ou hemocele do inseto (Wallace, 1966); os protozoários haplosporídeos, destacando-se neste grupo *Haplosporidium simulii*, endoparasita que produz esporos e encontra-se principalmente no tecido abdominal de seus hospedeiros; três tipos de vírus encontrados no citoplasma das células destes insetos: vírus iridiscentes, vírus da polihedrose citoplasmática e vírus da denonucleose, mas parecem não ser muito específicos (Weiser, 1968). Entre as bactérias além, do *B. thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) amplamente utilizada no controle biológico, se encontra na natureza *B. sphaericus*, em adultos do complexo *S. damnosum* (Weiser, 1984). Outro grupo de grande importância no controle natural de borrachudos são os fungos parasitas.

Entre os fungos parasitas temos que a espécie de maior importância é *Coelomycidium simulii* Debaisieux, 1919 (Chytridiales), por ser um parasita específico de simulídeos. Observa-se formando numerosas esferas brancas pequenas que invadem internamente todo o corpo da larva. Essas estruturas são os esporangios, os quais ao morrer a larva, livram zoosporos uniflagelados. Segundo Lacey & Undeen (1986), os zoosporos não infectam diretamente as larvas sadias, o que leva a crer que deve existir outro hospedeiro intermediário envolvido na transmissão do fungo. O parasita se desenvolve às expensas dos tecidos da larva; o fungo secreta enzimas que dissolvem o corpo adiposo e posteriormente o tecido muscular, as glândulas salivares, os túbulos de Malpighi e outros órgãos até que só permanecem porções cuticulares do corpo da larva (Weiser & Undeen, 1981). O parasitismo previne a maturação das gônadas e as larvas não completam sua metamorfose para pupa e adulto. Fungos Saprolegniales e Trichomycetes também têm sido registrados em simulídeos (Crosskey, 1990).

Além dos parasitas e patógenos anteriormente mencionados há uma série de animais vertebrados e invertebrados que exercem um controle natural de simulídeos por serem predadores destes. Entre os vertebrados os mais importantes são os peixes e entre os invertebrados predadores temos insetos das ordens Coleoptera, Ephemeroptera, Megaloptera, Odonata, Plecoptera e Trichoptera; além dos celenterados do gênero *Hydra* e alguns crustáceos (Crosskey, 1990). Existem também registros de invertebrados

ectoparasitas de simulídeos como os ácaros hidracaríneos (Prasod & Cook, 1972; Bottger, 1976).

No Brasil, o controle de borrachudos iniciou-se na década de 50 no litoral norte do estado de São Paulo. Inicialmente o controle foi baseado no emprego de inseticidas químicos organoclorados (DDT e BHC) e posteriormente esses inseticidas foram substituídos pelo organofosforado temefós (Abate[®]) (Andrade, 1989). A aparição da resistência de várias espécies de borrachudos, inclusive *S. pertinax* ao temefós no litoral do estado de São Paulo e Rio de Janeiro (Andrade *et al.*, 1987), no estado de Rio Grande do Sul (Ruas Neto, 1984) e no estado de Paraná (Guimarães, 1986) fizeram com que aos poucos se iniciassem projetos usando *B. thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) com as formulações Teknar e Vectobac para o controle de borrachudos nesses estados (Ruas Neto, 1984; Andrade & Castello Branco, 1991).

Paralelamente no Brasil, vem-se fazendo estudos com relação a busca de agentes com potencial para o controle biológico de simulídeos. Esses estudos ainda são poucos, tendo-se muitas interrogativas sobre aspectos básicos de sua ecologia.

Quanto ao manejo Integrado de Pragas (MIP), podemos dizer que teve suas bases principalmente lançadas para as pragas agrícolas entre 1950 e 1960, e posteriormente para os insetos na Saúde Pública (Olson, 1979; Womeldorf, 1979). O MIP é Ecologia Aplicada e tem origem na Ecologia de Populações (Levins & Wilson, 1980) podendo-se resumir como um conjunto de medidas, incluindo métodos de controle mecânico, químico e biológico, desenvolvimento de pesquisas ecológicas, genéticas, química de repelentes e atraentes, desenvolvimento de pesticidas, políticas e programas educativos, que integradas trariam as populações do inseto alvo a um nível suportável (Andrade, 1989).

No Brasil, apesar de terem sido feitos alguns trabalhos em relação ao controle integrado de simulídeos (Ruas Neto & Matias, 1985; Andrade, 1987), ainda é necessário um maior empenho e apoio dos órgãos oficiais relacionados ao assunto.

2.2. Nematódeos parasitas da família Mermithidae.

2.2.1. Posição taxonômica.

Segundo Poinar (1983) a família Mermithidae está posicionada taxonomicamente da seguinte forma:

Phylum: Nematoda

Classe: Adenophorea

Subclasse: Enoplia

Ordem: Mermithida

Subordem: Mermithina

Superfamília: Mermithoidea

Família: Mermithidae

As características diagnósticas que Nickle em 1972 proporciona para a superfamília Mermithoidea, família Mermithidae são:

Vermes longos e delgados, com comprimento de 1-50 cm (os nematódeos parasitas de simuliídeos podem alcançar até 3 cm). Cutícula lisa, sem fibras entrecruzadas com exceção do gênero *Mermis* Dujardin, 1842. Cabeça com quatro papilas submedianas e duas laterais. Anfídios presentes. Boca e esôfago provavelmente não funcionais em adultos. Estoma de larvas preparasíticas e pós-parasitas com um estilete penetrante. No adulto, o intestino é substituído por um pseudointestino ou trofosoma, que serve como órgão de armazenamento. Anus ausente. Gônadas pareadas em ambos os sexos. Vulva em posição ventral, vagina muscular em forma de “S” ou barril. Nos adultos sexualmente maduros o útero encontra-se cheio de ovos. Ovos de tamanho variável dependendo do gênero. Espículos pareados ou simples. Cauda do macho com numerosas papilas, agrupadas em três ou mais filas que bifurcam-se ao redor da abertura para o espículo.

Estágios parasitas larvais em invertebrados terrestres e aquáticos. O adulto não se encontra na cavidade do corpo do inseto, seu modo de vida é livre e não se alimenta.

2.2.2. Ciclo de vida.

Os mermitídeos aquáticos que atacam simulídeos vivem nas mesmas correntes de água que suas larvas hospedeiras, mas geralmente submersos no substrato, onde os adultos copulam e põem ovos, dos quais emergem os preparasíticos que infectam a larva hospedeira, penetrando com ajuda de um estilete retráctil.

O ciclo de vida dos mermitídeos inclui cinco etapas e quatro mudas: ovo, preparasítico juvenil, parasita juvenil, pós-parasita juvenil e adulto de vida livre (Figura 1.). Dependendo grandemente da temperatura, os parasitas juvenis podem encurtar ou alongar o tempo de permanência dentro do hospedeiro. Em climas frios a etapa parasita dura várias semanas ou meses, mas em condições tropicais esta etapa pode ser completada em uma ou duas semanas. O desenvolvimento da etapa parasita de *Isomermis lairdi* Mondet, Poinar & Bernadou, 1977, por exemplo, dura entre 10 a 17 dias no complexo *S. damnosum* no leste da África e o ciclo de vida inteiro pode ser completado em 4 a 5 semanas (Mondet, 1981). A maturação dos pós-parásitas juvenis a adultos ocorre depois do verme ter abandonado o hospedeiro por simples pressão mecânica, a larva do inseto perde seus fluidos internos e morre. Os adultos poucos dias depois copulam e começa a oviposição (Petersen, 1985). Os ovos usualmente são esféricos, transparentes, e tem sobre sua superfície pequenas quantidades de matéria gelatinosa.

A forma parasita do mermitídeo é a única que se alimenta. Este passa a se nutrir dos tecidos e da hemolinfa do hospedeiro armazenando reservas energéticas em seu trofosoma. Estas reservas serão posteriormente consumidas durante as etapas pós-parasita e adulta, especialmente para os processos de maturação de gônadas e gametogênese (Nickle, 1972; Petersen, 1985).

A maioria dos mermitídeos tem ciclo de vida direto empregando um só hospedeiro, mas algumas espécies apresentam um ciclo de vida indireto, utilizando-se de hospedeiros paratênicos para alcançar o hospedeiro principal. O mermitídeo *Pheromermis* sp. por exemplo, se vale de tricópteros e plecópteros como hospedeiros paratênicos, para então parasitar vespas predadoras (Poinar Jr., 1983).



Figura 1. Ciclo de vida de um nematódeo da família Mermithidae.

2.2.3. Mermitídeos parasitas de simúlideos e sua distribuição geográfica.

A maioria dos nematódeos parasitas naturais de simúlideos pertencem à família Mermithidae. Mais de 60 espécies de mermitídeos são descritas ocorrendo em mais de 70 espécies de borrachudos (Poinar Jr., 1981).

Mermitídeos de simulídeos estão amplamente distribuídos no mundo todo e são registrados desde o ártico até os trópicos, mas não foram registrados na Austrália nem na Nova Zelândia (Crosskey, 1990).

Rubtsov (1981), a partir da análise de mais de 10.000 indivíduos, chegou a conclusão de que dos 40 gêneros da família Mermithidae, 5 gêneros parasitam simulídeos na Europa, África e Ásia com a seguinte ordem de incidência: *Mesomermis* (= *Neomesomermis*), *Gastromermis*, *Limnomermis*, *Isomermis* ou *Espiculimermis*. Pelo contrário, a ordem de frequência dos gêneros desses parasitas em simulídeos da América do Norte e do Trópico Americano é: *Isomermis*, *Gastromermis*, *Mesomermis* (= *Neomesomermis*) e alguns representantes dos gêneros *Limnomermis*, *Hydromermis* e *Octomyomermis* (Poinar, 1981).

Algumas das principais espécies de mermitídeos de simulídeos promissoras como possíveis agentes de controle biológico são: *Mesomermis fluminalis*, distribuída principalmente na América do Norte; *Gastromermis viridis*, registrada também na América do Norte; *Isomermis wisconsinensis*, registrado em Wisconsin e Newfoundland mas provavelmente em toda a América do Norte e *I. lairdi*, parasita mais comum do complexo *S. damnosum* na África ocidental (Poinar Jr., 1981), observado geralmente em pupas e adultos de *S. vittatum*.

Na região neotropical, registrou-se na Argentina a espécie *Octomyomermis longispiculae* Camino, 1992 parasitando larvas de *S. wolffhuegeli* Enderlein, 1922 (Camino, 1992) e as espécies, *Gastromermis doloresi* Camino, 1993 parasitando *S. wolffhuegeli* e *Hydromermis doloresi* Camino, 1993 parasitando *Simulium jujuyense* Paterson & Shannon, 1927 (Camino, 1993). Na Colômbia, na região de Chisaca, Acero (1991) encontrou e descreveu *Isomermis* sp. parasitando larvas de *Simulium ignescens* Roubaud, 1906, *Simulium furcillatum* Wygodzinsky & Coscarón, 1982, *Simulium bicornutum* Wygodzinsky & Coscarón, 1982, *Simulium muisorum* Bueno, Moncada & Muñoz, 1979 e *Simulium* sp., enquanto Torres *et al.* (1991) encontraram larvas de *S. ignescens* e *S. muisorum* parasitadas por nematódeos da família Mermithidae em La Calera, Cundinamarca. No Brasil, foi registrado a infecção por nematódeos da família Mermithidae em várias espécies de borrachudos no sul e sudeste do país (Castello Branco

Jr. & Andrade, 1988; Castello Branco Jr. *et al.*, 1987; 1993; Fetzner & Strider, 1996; Ambrós *et al.*, 1996).

2.2.4. Patogenicidade dos mermitídeos.

Alguns estudos têm sido feitos com relação aos danos que o parasitismo por mermitídeo provocam no hospedeiro simulídeo. Strickland (1911), relata que os mermitídeos reduzem o corpo adiposo da larva de simulídeo e inibem a formação do histoblasto e dos filamentos branquiais da pupa. Mas estes efeitos na larva dependem do estágio em que se encontra quando o parasita penetra. Mondet *et al.* (1976) indicaram que pupas de *Simulium damnosum* podem ter um ou dois mermitídeos juvenis e apresentar o corpo adiposo e os histoblastos normais. Neste caso, o parasita pode acompanhar o hospedeiro ao estágio de pupa e/ou ao inseto adulto.

Mondet *et al.* (1976) observaram a atrofia dos ovários em 98,9% das fêmeas de *S. damnosum* parasitadas com *Isomermis lairdi* e observaram também redução ou ausência do corpo adiposo em 80% das fêmeas parasitadas. Molloy (1987) relatou que a presença do nematódeo pode ocasionar mudanças na textura das glândulas salivares e inibir a formação do histoblasto branquial na larva do inseto; em geral, as larvas parasitadas são menores que as outras de mesma idade, o que pode-se dever à diminuição dos corpos adiposos.

Os mermitídeos fêmeas por terem um tamanho maior, destroem as larvas de simulídeos (Gordon, 1984) e estas não alcançam a fase de pupa (Molloy, 1979). As larvas de simulídeos parasitadas pelo mermitídeo macho passam à fase de pupa, desenvolvem o histoblasto e o nematódeo permanece até o simulídeo mudar para adulto. Os adultos parasitados podem ser estéreis (Rubsov, 1958), ter o tecido muscular reduzido (Peterson, 1960), o tamanho do corpo adiposo diminuído (Colbo, 1982) e até sofrerem morte prematura. Castello Branco, Jr. (1994) indicou para *Gastromermis viridis* parasitando *S. pertinax*, que este parasita causou uma significativa redução na quantidade de tecido adiposo do hospedeiro e alterações histológicas no tecido muscular e glândulas salivares.

As formas preparasíticas do mermitídeo *Mesomermis fluminalis* atacam a região torácica das larvas de borrachudo, furando e penetrando o hospedeiro em alguns minutos. Durante esse período e mesmo algum tempo após, a larva do borrachudo fica paralisada, voltando gradualmente ao movimento normal (Molloy & Jamnback, 1975). Shamseldean & Platzer (1989) observaram um fenômeno semelhante em larvas de diferentes espécies de culicídeos ao serem infectadas por *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith, 1976.

2.3. Protozoários microsporídeos parasitas de simulídeos.

2.3.1. Posição taxonômica e distribuição geográfica.

Os microsporídeos são organismos unicelulares pertencentes ao Filo Microspora (Levine *et al.*, 1980). Por serem protozoários que desenvolvem esporos, até recentemente classificavam-se como uma ordem da classe Sporozoa (Westphal, 1977).

Infeção por microsporídeos em larvas de simulídeos foi observada pela primeira vez por Léger (1897) na França, posteriormente foram encontrados no Brasil (Lutz & Splendore, 1904) e nos Estados Unidos (Strickland, 1911), e 20 anos depois foram registrados em África Tropical (Henrard, 1930). Uma vez que as infecções por microsporídeos estão amplamente distribuídas geograficamente, afetam várias espécies de simulídeos e envolvem espécies que são específicas para simulídeos. Atualmente são conhecidas cerca de 30 espécies, ocorrendo em mais de 60 espécies de simulídeos no mundo todo. Existem 6 famílias de Microspora que têm sido encontradas parasitando simulídeos: Amblyosporidae, Caudosporidae, Culicosporidae, Nosonematidae, Thelohaniidae e Tuzertiidae. Ainda existe um grupo coletivo chamado de Microsporidium pelos protozoologistas, onde se colocam aquelas espécies que não se tem certeza da sua posição taxonômica (Crosskey, 1990).

Algumas espécies de microsporídeos, por exemplo, *Amblyospora bracteata*, *Amblyospora fibrata*, *Amblyospora varians*, *Janacekia debaisieuxi* e *Polydispyrenia multiespora*, são virtualmente cosmopolitas e muito seletivas quanto ao hospedeiro (predominantemente parasitam *Simulium*). Tais microsporídeos ocorrem em regiões

tropicais e temperadas (Weiser & Undeen, 1981). Outras são mais hospedeiro-específicas, preferencialmente infectam espécies particulares quando outros hospedeiros potenciais de simúlideos estão presentes na mesma corrente da água. Essas espécies são geograficamente e topograficamente mais restritas. *Caudospora* e *Weiseria* são principalmente parasitas de *Prosimulium* em correntes frias do norte, algumas espécies de *Thelohania* tem sido encontradas só em regiões montanhosas da parte central asiática da antiga URSS e *Hirsutosporos austrosimulii* é conhecida só em larvas de *Austrosimulium* na Nova Zelândia (Crosskey, 1990).

2.3.2. Ciclo de vida de Microspora.

Os microsporídeos são parasitas intracelulares obrigatórios. A infecção inicial ocorre quando os esporos são ingeridos durante a alimentação das larvas e alcançam a luz do intestino do inseto. A ação do pH e de enzimas digestivas intestinais fazem então, com que ocorra a extrusão do filamento polar. Através deste filamento o esporo injeta seu conteúdo, especialmente o núcleo e parte do esporoplasma (célula infectante ou germe) no interior da célula hospedeira. A partir deste momento ocorrem duas fases: a merogonia e a esporogonia. A merogonia é uma fase de proliferação, onde os merontes formados nesta etapa podem ter um ou dois núcleos. Estes dividem-se repetidamente por divisão binária ou por esquizogonia. Em continuação ocorre a fase de esporogonia onde os esporontes desenvolvem-se em esporoblastos e estes em esporos. Os esporoblastos podem ter um ou dois núcleos e podem-se dividir binariamente em esporoblastos ou alternativamente, se tornarem estágios multinucleados (plasmódio esporogonial) (Weiser, 1976).

Alguns gêneros têm como característica o desenvolvimento dos esporoblastos em vesículas conhecidas como vesículas do esporóforo, pansporoblasto ou vacúolo parasitóforo, contendo em cada vesícula um número de esporos característico para cada gênero.

Além da transmissão da infecção por microsporídeos mediante a ingestão dos esporos (transmissão horizontal), pode ocorrer transmissão por fêmeas infetadas que transmitem o patógeno aos ovos (transmissão vertical) (Larsson, 1986).

Na infecção vertical, ocorrem as fases de merogonia e esporogonia igual à da horizontal, só que nos oócitos as fêmeas infectadas (transmissão transovariana) ou nas glândulas anexas, contaminando o córion do ovo (transmissão transovigênica).

2.3.3. Patogenicidade dos microsporídeos.

Os microsporídeos estão entre os entomopatógenos mais comuns encontrados em simulídeos. Os microsporídeos ocorrem geralmente nas formas imaturas dos borrachudos (Frost, 1970; Weiser & Prasertphon, 1982; Garcia *et al.*, 1989; Crosskey, 1990; Castello Branco Jr., 1991) e com menor frequência em adultos (Undeen, 1981).

A célula hospedeira, quando infectada, apresenta geralmente o núcleo hipertrofiado com a presença de vários nucléolos, evidenciando a ação do patógeno no seu metabolismo protéico (Castello Branco Jr., 1994; Castello Branco Jr. & Habib, 1995) Usualmente só o tecido adiposo das larvas de simulídeos encontra-se infectado e o corpo adiposo é o principal ou único sítio onde registra-se microsporídeos em muitas espécies hospedeiras. Esses parasitas, não obstante, algumas vezes invadem o citoplasma e células de outros órgãos, e têm sido encontrados em cromatócitos (células do pigmento), hemócitos, células do epitélio intestinal e outros sítios do corpo. *Amblyospora varians* por exemplo, multiplica-se no corpo adiposo e algumas vezes penetra nas células das glândulas da seda e nos tubulos de Malpighi (Weiser & Undeen, 1981).

As infecções por microsporídeos que afetam o trato digestivo produzem a morte do inseto por inanição (Liu, 1984) e as que afetam o tecido adiposo das larvas impedem sua metamorfose até fase adulta devido à produção de uma substância de ação juvenilizante (Fisher & Sanborn, 1962). As microsporidioses em insetos também provocam diminuição da fecundidade, frequência de acasalamento e redução do consumo de alimentos em insetos fitófagos (Torres *et al.*, 1991).

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. Coleta do material no campo.

O material utilizado no presente estudo consistiu de larvas de simulídeos parasitadas. Para a obtenção das mesmas, realizou-se um levantamento de larvas de simulídeos durante o período de fevereiro de 1996 a maio de 1998 em localidades de sete municípios do estado de São Paulo, dois municípios do estado de Paraná, dois do estado de Rio Grande do Sul, um município do estado de Mato Grosso, três do estado de Santa Catarina e um do estado de Minas Gerais. Além disso, utilizou-se material proveniente da localidade de Canudos, Município de Ilhabela/SP que tinha sido coletado em janeiro de 1994.

As localidades onde foram realizados os levantamentos são apresentadas na Tabela 1.

A procura de larvas de simulídeos realizou-se em cada localidade para cada uma das coletas feitas, em vários pontos do curso da água, sendo de 30 metros aproximadamente a distância entre cada ponto e cerca de três horas o tempo investido na coleta de material para cada curso de água.

As larvas de simulídeos eram procuradas em raízes e folhas da vegetação marginal que ficam parcialmente imersas na água, resultando um ótimo substrato para fixação dessas formas de simulídeos; também eram procuradas em galhos e folhas mortas submersas que ficam presas nas pedras, sobre pedras que ficam em trechos encachoeirados, assim como em rampas de cimento, que se encontram à jusante de lagos.

As larvas de simulídeos foram coletadas com a mão retirando-as do substrato onde encontravam-se aderidas e foram transportadas vivas ao laboratório em sacolas plásticas, dentro de uma caixa de isopor com gelo.

Tabela 1. Localização dos cursos d'água aonde as coletas foram realizadas.

Estado	Município	Lugar	Nome do curso d'água	Criadouro	Sigla	
São Paulo	Ilhabela	Canudos	Rio Castellanos	Leito do riacho	IB	
	Barra do Una	Fazenda Cachoeiras	Rio Cristina	Leito do riacho	BU	
	Campinas	Cidade Universitária 2	Lago da UNICAMP I	Rampa de cimento à jusante do lago	CA-2	
	Campinas	UNICAMP	Lago da UNICAMP II	Rampa de cimento à jusante do lago	UNICAMP	
	Morungaba	Fazenda Cachoerinhas	Rio Jaguari	Leito de riacho	MR-LR	
	Morungaba	Fazenda Cachoerinhas	Rio Jaguari	Rampa de cimento à jusante do lago	MR-R	
	Paulínia	Parque Ecológico	Lagoa do parque	Rampa de cimento à jusante do lago	PAUL	
	Jundiaí	Serra do Japi	Rio Jundiaí	Leito do riacho	SJ-LR	
	Jundiaí	Serra do Japi	Rio Jundiaí	Rampa de cimento à jusante do lago	SJ-R	
	Leme	República do Lago	Riacho do lago	Leito do riacho	LEM	
	Sorocaba	Floresta Nacional de Ipanema	Rio Ribeirão de Ferro	Leito do riacho	SOR	
	Paraná	Tibají	Fazenda da Ilha Iuerá	Ribeirão de Baixo	Leito do riacho	T-IU
		Rolândia	Pesque e Pague / Bandeirantes	Córrego Coruja	Leito do riacho	ROL
Rio Grande do Sul	São Francisco de Paula	Parque Municipal	Cachoeira Grande	Leito do riacho	SFP	
	Barão	Fazenda	Arroio Barão	Leito do riacho	BAR	
Mato Grosso	Chapada dos Guimarães	Salgadeira	Rio Coxipó do Ouro	Leito do riacho	CHG	
Santa Catarina	Santo Antônio de Atalanta	Fazenda	Rio	Leito do riacho	SAA	
	Florianópolis	Bairro Quilombo	Rio Quilombo	Leito do riacho	FLO	
	Itapema	Fazenda	Rio Perequê	Leito do riacho	ITA	
Minas Gerais	Montes Verdes	Portal	Rio da Vila	Leito do riacho	MV	

Os criadouros foram caracterizados pela temperatura ambiental e temperatura da água, ambas medidas com um termômetro de mercúrio, pH com aparelho Q 403 B da Quimis, velocidade da corrente de água com fluxômetro 20 30R da General Oceanics Inc. Outras características como largura, profundidade, tipo de substrato e vegetação circundante também foram registradas.

Na localidade da Serra do Japi, município de Jundiaí/SP realizou-se um estudo de prevalência de mermitídeos e microsporídeos em larvas de simúlídeos durante o período de maio de 1996 a maio de 1998. O riacho estudado nesta localidade corria sobre um leito arenoso e pedregoso em quase toda sua extensão, apresentando alguns pontos encachoeirados. Além disso existe uma zona onde acumula-se água, formando um lago, e

tendo uma rampa com paredes e piso de cimento à jusante do mesmo, por onde sai a água acumulada no lago (ver Figura 10 em Anexos). Praticamente toda a extensão do riacho era margeada por mata ciliar e gramíneas, cujas raízes e folhas ficavam parcialmente imersas na água, servindo as vezes de substrato para fixação de larvas e pupas de simulídeos, embora geralmente encontraram-se fixadas a galhos e folhas mortas submersas na água, e na rampa de cimento à jusante do lago. Para a realização do estudo foram feitas coletas de larvas de simulídeos, uma vez por mês, ao longo do leito do riacho e na rampa de cimento à saída do lago. Durante este período houve afetações na coleta por problemas do transporte e acesso à Serra do Japi.

3.2. Avaliação do parasitismo no laboratório.

No laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Zoologia, IB-UNICAMP, as larvas de simulídeos coletadas foram separadas em três categorias: larvas pequenas, médias e grandes. Para esta categorização, utilizou-se como critério a presença e o desenvolvimento dos histoblastos respiratórios (Mulla & Lacey, 1976). Seguindo-se esse critério, as larvas pequenas não apresentam histoblastos respiratórios (larvas de primeiro até quarto estágio), as médias possuem os histoblastos respiratórios mas ainda não encontram-se bem desenvolvidos (larvas de quinto e sexto estágio), e as grandes possuem os histoblastos respiratórios visíveis e bem desenvolvidos (larvas de sétimo estágio ou mais). Os dados foram examinados através do teste de χ^2 com nível de significação de $\alpha=0,05$, para se determinar a dependência entre a porcentagem de parasitismo por categoria larval e a espécie de simulídeo.

Dentro de cada classe de tamanho as larvas parasitadas foram separadas das sadias. O exame do parasitismo nas larvas realizou-se com ajuda de microscópio estereoscópico e/ou microscópio óptico. Finalmente, foi estimada a porcentagem de parasitismo para cada localidade e espécie.

3.3. Procedimentos para a identificação das espécies parasitas e hospedeiras.

As larvas parasitadas com nematódeos foram colocadas em placas de Petri com água destilada e mantidas em uma incubadora a 10°C até a emergência das formas pós-parasitas as quais foram colocadas em areia úmida a uma temperatura de 17°C para a obtenção dos adultos. Tanto os pós-parasitas como os adultos foram mortos em água quente a 70°C, fixados em T.A.F. (composto por 2 ml de Trietanolamina, 7 ml de Formol 40% e 100 ml de água destilada) e clarificados em glicerina mediante o método de evaporação simples (Poinar Jr., 1975). Estes finalmente foram montados em lâminas em gelatina glicerinada (composta por 10 g de folha de gelatina branca, 70 ml de glicerina, 0,5 ml de fenol e 60 ml de água destilada) e sua identificação foi feita segundo Rubtsov (1981) e Mulvey & Nickle (1978). Além disso, fêmeas fixadas em T.A.F. foram lavadas com água durante 24 horas, sendo então processada a desidratação do material em gradiente de etanol (60% a 100%) para posterior inclusão em “paraplast”. Foram realizados cortes seriados com 7 µm de espessura e corados com Hematoxilina de Erlich e contrastados com Eosina. Este mesmo processo foi realizado para a observação histológica de larvas de simulídeos parasitadas, com microsporídeos e com mermitídeos, assim também como de larvas sadias para comparação.

Com relação às larvas de simulídeos infectadas com microsporídeos foram obtidos de amostras de tecidos infectados realizando-se esfregaços os quais foram corados por 15 minutos com uma solução de Giemsa ao 10%. Também foram realizadas outras técnicas de coloração para microsporídeos: coloração pelo Gram - Cromótopo (Moura *et al.*, 1996); coloração pelo Ácido Tricromio modificada (Dieder *et al.*, 1995); e coloração pelo AFT (Ignatius *et al.*, 1997). Em todos os casos previamente à coloração dos esfregaços, estes foram deixados secar ao ar e posteriormente fixados durante 3 minutos em álcool metílico, excetuando-se para a coloração do Gram - Cromótopo, quando foram fixados a quente. A identificação dos microsporídeos foi baseada em Weiser (1982, 1991) e do fungo em Weiser (1977).

As larvas de simulídeos sadias foram fixadas em álcool 70%, e sua identificação foi baseada nas descrições de Vulcano (1959), Maia - Herzog *et al.* (1984), Shelley *et al.* (1984) e Coscarón (1987).

3.4. Criação das formas de vida livre de *Isomermis* sp. no laboratório.

Para os estudos sobre a criação de *Isomermis* sp. no laboratório, após a emergência dos pós-parasitas das larvas coletadas na Serra do Japi (SJ-R), estes foram sexados e colocados em um recipiente (8 x 5 cm) com areia de rio previamente lavada e fervida. Colocou-se um pouco de água destilada para facilitar a introdução dos nematódeos na areia e na descida movimentando-se através desta. Foi retirada a água destilada com ajuda de uma pipeta e o recipiente foi fechado. Tendo em consideração indicações encontradas na literatura para outras espécies de mermitídeos, entre cinco e dez semanas depois o recipiente foi inundado com água destilada para se obter as formas infectivas ou pre-parasíticas, e transcorridas três horas, o inóculo (água com as formas preparasíticas) foi coletado em um “beaker” graduado. Posteriormente realizou-se a avaliação do número de preparasíticos obtidos mediante o método de diluição volumétrica (Petersen & Willis, 1972).

3.5. Observação do processo de muda das formas pós-parasitas de *Isomermis* sp. no laboratório.

Os pós-parasitas foram colocados em uma placa de Petri (5,3 cm x 1,3 cm) com água destilada e mantidos a uma temperatura entre 22°C e 24°C. Os mermitídeos foram controlados diariamente até se observar a muda do pós-parasita a adulto de vida livre.

3.6. Criação de hospedeiros alternativos.

Tendo em consideração a dificuldade de criação de simulídeos no laboratório, tentou-se criar insetos pertencentes a outras famílias, com o objetivo de realizar

posteriormente testes da susceptibilidade a *Isomermis* sp., visando a manutenção da fase parasita deste mermitídeo no laboratório.

Realizou-se a criação no laboratório de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Para a criação deste díptero, foram utilizadas larvas coletadas em caixas de cimento que encontram-se ao fundo do Departamento de Zoologia da UNICAMP e foram colocadas em bacias (30 cm x 10 cm - largura x profundidade-) contendo água do criadouro onde foram coletadas. A alimentação das larvas foi feita com farinha de fígado. Uma vez que as larvas começaram a empupar, as bacias foram colocadas dentro de uma gaiola (80 cm x 80 cm) feita com uma armação de madeira e revestida com tela plástica de malha fina. Para a alimentação dos machos adultos utilizou-se uma solução de mel (10%) e ratos recém nascidos, foram colocados em caixas plásticas quadradas (10 cm x 5 cm de profundidade) dentro das gaiolas e oferecidos duas vezes por semana durante a noite para que as fêmeas se alimentassem. Diariamente foi tomada a temperatura e umidade relativa três vezes ao dia na sala onde foram desenvolvidas as criações.

Tentou-se também a criação no laboratório de dípteros das famílias Psychodidae e Chironomidae, utilizando-se larvas coletadas respectivamente em banheiros residenciais e pneus. As larvas coletadas foram colocadas em bacias quadradas de 10 cm por 4 cm de profundidade que continham água do criadouro, água destilada ou água da torneira, acrescentando-se farinha de fígado para alimentação das mesmas.

Realizou-se também a criação ao ar livre de quironomídeos, utilizando-se uma calha de 400 cm de comprimento por 30 cm de largura e por 40 cm de profundidade. Nessa calha colocou-se água da torneira até um altura de 7 cm e matéria orgânica, na forma de 0,5 Kg de grama cortada.

3.7. Avaliação no laboratório de *Isomermis* sp. em hospedeiros alternativos.

Para a avaliação de *Isomermis* sp. em hospedeiros alternativos foram realizados os seguintes ensaios no laboratório:

-Teste utilizando as larvas de *Aedes albopictus* Skuse, 1895 dos quatro estádios larvais, provenientes da criação do Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia da UNICAMP; 20 larvas de cada estágio foram colocadas em recipientes plásticos (8 cm x 5 cm) contendo 50 ml de água destilada e posteriormente foram expostas aos preparasíticos em doses de 20:1, 35:1, 50:1 e 90:1, considerando estudos feitos por outros autores para outras espécies de mermitídeos. Colocou-se também um grupo controle para cada dose empregada que consistiu em grupos de 20 larvas de cada estágio colocadas em recipientes contendo 50 ml de água destilada, sem a exposição aos preparasíticos.

-Teste utilizando as larvas de Chironomidae: 20 larvas foram colocadas em recipientes plásticos (8 cm x 5 cm) contendo 50 ml de água (25 ml de água destilada e 25 ml de água do próprio criadouro). A dose de preparasíticos utilizada foi de 17:1. Colocou-se um grupo controle que consistiu em um grupo de 20 larvas colocadas em um recipiente contendo 25 ml de água destilada e 25 ml de água do criadouro. O grupo controle não foi exposto aos preparasíticos.

-Teste utilizando as larvas de Ephydriidae coletadas em uma caixa plástica, contendo água e grama, proveniente do quintal de uma casa na Cidade Universitária, Campinas/SP: 20 larvas foram colocadas em recipientes plásticos (8 cm x 5 cm) contendo água destilada e água do próprio criadouro em partes iguais. As doses de preparasíticos utilizadas foram de 10:1 e 50:1. Colocou-se um grupo controle por dose empregada, que consistiu em 20 larvas colocadas em um recipiente contendo 50 ml de água destilada, sem a exposição aos preparasíticos.

-Por último realizou-se um teste com larvas de Simuliidae da espécie *Simulium (Inaequalium) subnigrum*: 15 larvas de terceiro estágio foram colocadas em uma placa de petri (9 cm x 1,5 cm) contendo 3 mm de água destilada e mantidas em uma incubadora a uma temperatura de 17°C, as larvas foram expostas aos preparasíticos durante três dias em uma dose de 6:1. Colocou-se um grupo controle que consistiu em 15 larvas de terceiro estágio, colocadas em uma placa de petri contendo 3 mm de água destilada. O grupo controle não foi exposto aos preparasíticos.

Em todos os ensaios realizados as larvas foram alimentadas com uma mistura de farinha de fígado e ração para peixes (1:1). As larvas e as pupas mortas, assim como os adultos que emergiam foram dissecados com ajuda de estiletos entomológicos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Levantamento de larvas de simúlídeos parasitadas.

Os resultados que correspondem a caracterização dos criadouros onde foram realizados os levantamentos são apresentados na Tabela 2.

A Tabela 3 indica a presença ou ausência de parasitismos por microsporídeos e nematódeos nas espécies de simúlídeos registradas nas vinte localidades pesquisadas. Pode-se observar que nenhuma parasitose foi achada nas localidades pesquisadas no município de Campinas/SP (CA-2 e UNICAMP) onde a maioria das larvas de simúlídeos encontradas pertenceram à espécie *Simulium (Hemicnetha) brachycladum* Luz & Pinto, 1931. Ausência de parasitismo foi registrada também na localidade pesquisada no estado de Mato Grosso, a Chapada dos Guimarães (CHG), após a revisão de 368 larvas de *Simulium (Chirostilbia) laneportoi* Vargas, 1941 e nas 231 larvas de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* coletadas em Florianópolis/SC sobre pedras e lixo submerso na água (Tabela 4).

Após a análise de 411 larvas de *S. (Ch.) pertinax* em Ilhabela (IB) não se encontrou parasitismo por microsporídeos nem mermitídeos, embora possa-se registrar pela primeira vez nesta localidade a ocorrência de micose nessa espécie (0,49%), causada por *Coelomycidium sp.* (Tabela 5). Esta localidade foi submetida durante vários anos ao controle químico e na atualidade se emprega o controle biológico com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sorotipo H-14.

As larvas de *S. (Ch.) pertinax* infectadas pelo fungo apresentaram pequenas esferas brancas ao longo do corpo, sendo visíveis através da cutícula. Essas estruturas correspondem aos esporângios do patógeno que ocupam toda a cavidade do corpo (Figura 2.).

Segundo Nolan (1981), um dos principais representantes do gênero *Coelomycidium* (*C. simulii*), entre esses microorganismos o que apresenta maiores perspectivas para o controle biológico de simúlídeos. Este fungo tem sido cultivado “in

vitro” utilizando-se vários meios de cultura de tecidos, no entanto sem a produção de zoósporo.

Tabela 2. Caracterização dos criadouros estudados quanto os aspectos físico-químicos e biológicos.

Localidade (sigla)*	Temperatura (°C) ambiente-água		pH	Largura (m)	Profundidade (cm)	Velocidade da água (cm/s)	Substrato	Vegetação circundante
IB	23	20	5,5	12,5	2,5	141	pedra	mata ciliar
BU	30	29	5,5	4,5	2	80	folha, galho**	mata ciliar
CA-2	30	29	5,5	1	2,5	75	rampa, folha	capim
UNICAMP	30	29	5,5	1,12	2,5	31,3	garrafa plástica, folha, pedra	capim
MR-LR	21	22	5,5	2,4	6,5	136,5	folha, galho, pedra	capim, mata ciliar
MR-R	24	21	5,5	1,2	3	110	folha, galho, rampa	capim
PAUL	30	28,5	6,2	0,8	1,5	113	rampa, “nylon”	capim
SJ-LR	18	16	6,2	3	4,5	89	folha da vegetação marginal e morta, galho	capim, mata ciliar
SJ-R	18	16	6,2	1,5	3	181,5	rampa, folha	capim
LEM	24	22	7,8	1,5	4,5	123,5	folha, galho	capim, mata ciliar
SOR	27,5	23	7,6	2,5	5	35	folha, galho, pedra	capim, mata ciliar
T-JU	21	16	5,0	19	4	90	folha, pedra	campo de lavoura (aveia)
ROL	19	21	5,7	2,8	2,5	88	folha, pedra	campo de lavoura, mata ciliar
SFP	10	10	5,5	2,5	2,5	100	lixo	mata ciliar
BAR	17	15	5,5	2	6,5	60	folha da vegetação marginal	capim
CHG	26	25	5,5	4,5	3	120	pedra, folha, galho	capim, mata ciliar
SAA	16	15	5,5	2	2,5	40	pedra, folha, galho	campo de lavoura
FLO	19	18	5	1,3	3,5	37	pedras, lixo	capim, mata ciliar
ITA	18	17	5,5	2,5	4	80	pedra, folha, galho	capim, mata ciliar
MV	15	14	5,5	1,5	3,5	60	folha	capim

* ver Tabela 1 em Materiais e Métodos.

** refere-se a folhas e galhos mortos, caídos na água e presos entre as pedras.

Tabela 3. Presença ou não (+/-) de parasitismos por microsporídeos e nematódeos mermitídeos nas espécies de simuliídeos encontradas nas localidades estudadas.

Localidade (sigla)*	Parasita	Espécies												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
IB	Microsporídeo Nematódeo													
BU	Microsporídeo Nematódeo	+	-								-			
CA-2	Microsporídeo Nematódeo		-						-		-	-		
UNICAMP	Microsporídeo Nematódeo								-					
MR-LR	Microsporídeo Nematódeo		-				+	+	-	+	+			
MR-R	Microsporídeo Nematódeo		+			+	+		+	-	+			
PAUL	Microsporídeo Nematódeo								+					
SJ-LR	Microsporídeo Nematódeo	+		-	-		-			+				
SJ-R	Microsporídeo Nematódeo	-		-	-		-			-				
LEM	Microsporídeo Nematódeo		-			+								+
SOR	Microsporídeo Nematódeo							-		-				
T-IU	Microsporídeo Nematódeo					-				-	+			-
ROL	Microsporídeo Nematódeo							-		-				-
SFP	Microsporídeo Nematódeo		-					+					+	
BAR	Microsporídeo Nematódeo	+	+					+		+				
CHG	Microsporídeo Nematódeo												-	
SAA	Microsporídeo Nematódeo		+			-				-				
FLO	Microsporídeo Nematódeo					+				-				
ITA	Microsporídeo Nematódeo									+				
MV	Microsporídeo Nematódeo	-	-											

1: *S. (Psaraniocompsa) auripellitum*; 2: *S. (Psaraniocompsa) sp.*; 3: *S. (Inaequalium) subnigrum*; 4: *S. (Inaequalium) subclavibranchium*; 5: *S. (Inaequalium) sp.*; 6: *S. (Grenierella) pruinosum*; 7: *S. (Hemicnetha) rubrithorax*; 8: *S. (Hemicnetha) brachycladum.*; 9: *S. (Chirostilbia) pertinax*; 10: *S. (Chirostilbia) serranum*; 11: *S. (Cerqueirellum) sp.*; 12: *S. (Chirostilbia) laneportoi*; 13: *S. spp.*

* ver Tabela 1 em Materiais e Métodos.



Figura 2. Abdômen de larva de simulídeo infectada com *Coelomycidium sp.*
A seta indica os esporangios. 17,5 x.

Tabela 4. Espécies de simulídeos coletadas nas localidades onde não foi detectado parasitismo.

Localidade (sigla)*	Espécie (sub-gênero)**	Total coletado
CA-2	<i>S. (H.) brachycladum</i>	222
	<i>S. (P.)</i> sp.	4
	<i>S. (C.)</i> sp.	4
	<i>S. (Ch.)</i> sp.	1
UNICAMP	<i>S. (H.) brachycladum</i>	904
CHG	<i>S. (Ch.) laneportoi</i>	368
FLO	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	231

*ver Tabela 1. Em Materiais e Métodos.

**H: *Hemicnetha*; P: *Psaraniocompsa*; C: *Cerqueirellum*; Ch: *Chirostilbia*.

Fungos do gênero *Coelomycidium* têm sido registrados em algumas regiões do mundo infectando diferentes espécies de simulídeos (Adler & Kim, 1986; Weiser & Prasertphon, 1982). No Brasil, Fetzner e Strider (1996) registraram parasitismo por fungos em larvas de *S. pertinax* no estado de Rio Grande do Sul.

Tem-se no geral pouca informação da incidência de infecções por fungos do gênero *Coelomycidium*. Jamnback (1973), assinala que em Nova York a incidência de *C. simulii* não supera 1%, enquanto que Weiser & Undeen (1981), registram uma frequência máxima do 40% durante o inverno na Europa Central.

Tabela 5. Ocorrência de parasitismos por microsporídeos, nematódeos mermitídeos e fungos em larvas de uma espécie de simulídeo em Ilhabela/SP (IB).

Espécie (sub-gênero)*	Total coletado	No. larvas parasitadas / % parasitismo		
		Microsporídeos	Nematódeos	Fungos
<i>S. (Ch.) pertinax</i>	411	0 / 0	0 / 0	2 / 0,49

* Ch.: *Chirostilbia*.

4.1.1. Parasitismo por microsporídeos.

As larvas de simúlídeos coletadas que se encontravam parasitadas por microsporídeos se caracterizavam por apresentar massas globulares de cor branca no abdômen (Figura 3). Essas estruturas denominadas cistos ou xenomas (Sprague & Vernick, 1968) correspondem a lóbulos de tecido adiposo invadidos pelo parasita.

Os xenomas são próprios das microsporidioses em simúlídeos, com exceção de *Octosporea simulii* Debaisieux, 1926 que afeta só o epitélio intestinal. Maurand (1973, *apud* Torres, 1991) descreve três tipos de xenomas para microsporídeos em simúlídeos: (1) xenomas com marcada diferenciação centrípeta do parasita, envolvidos por uma membrana basal muito fina; (2) xenomas com maturação centrípeta do parasita formado por três zonas, a mais externa constituída por citoplasma da célula do hospedeiro; e (3) xenomas em que nos diferentes estados do parasita se dispõem indistintamente dentro do lóbulo, pelo que não apresenta diferenciação centrípeta.

Na localidade de Morungaba/SP observou-se parasitismo por *Polydispyrenia simulii* (Microspora: Duboscquiidae). Esta espécie de microsporídeo, se caracteriza por apresentar xenomas com marcada diferenciação centrípeta do parasita envolvidos por uma membrana basal muito fina (Torres *et al.*, 1991) e infecta só o tecido adiposo dos hospedeiros.

Na rampa de cimento localizada na saída do lago desta localidade (MR-R) observou-se alta porcentagem de parasitismo por *P. simulii* (24,06%). No leito do mesmo riacho (MR-LR) o parasitismo foi menor (1,32%). Esta diferença parece estar associada à porcentagem alta só para *Simulim (Chirostilbia) serranum* Coscarón, 1981 (48,93% na MR-R e 11,90% na MR-LR) associada à diferente distribuição relativa nesses dois microhabitats, caracterizados por diferentes tipos de substrato (Tabela 2). Parasitismo por esta espécie de microsporídeo encontrou-se também no leito do riacho em outra localidade do estado de São Paulo, Leme (LEM=5,68%). Nesta localidade a maior porcentagem de parasitismo observou-se também na mesma espécie, *S. (Ch.) serranum* (66,66%), mas deve-se destacar que esta porcentagem corresponde só a duas larvas parasitadas de um total de três larvas encontradas desta espécie de simúlídeo. Além de *S. (Ch.) serranum*,

nesta localidade encontrou-se parasitismo em larvas de *S. (Inaequalium) sp.* (11,23%) e em *Simulium sp.* (4,24%) (Tabela 6).

A análise pelo teste de χ^2 revelou para as localidades de Morungaba (MR-LR e MR-R) e Leme (LEM) que existem diferenças significativas quanto ao parasitismo por *P. simulii* por categoria larval (pequenas, médias e grandes) entre as espécies de simúlideos presentes em cada localidade. Podemos observar que na MR-LR, para *Simulium. (Hemicnetha) rubrithorax* Lutz, 1909, *S. (Ch.) pertinax* e *S. Ch.) serranum* as larvas médias tiveram uma maior ocorrência de parasitismo, mas para *Simulium (Grenierella) pruinatum* Lutz, 1910 as larvas grandes foram parasitadas em maior grau, embora tenha-se encontrado também parasitismo em larvas médias. Na rampa dessa mesma localidade (MR-R) para todas as espécies parasitadas a maior ocorrência de parasitismo foi em larvas médias, mas para *S. (H.) brachycladum* e *S. (G.) pruinatum* também estavam parasitadas as larvas grandes; para *S. (Ch.) serranum*, além da ocorrência alta para larvas médias e menor para grandes, observou-se ocorrência de parasitismo alto em larvas pequenas. Em *S. (Inaequalium) sp.* e *S. (Psaraniocompsa) sp.* só as larvas médias apresentaram ocorrência de parasitismo. Na localidade de Leme pode-se observar para *Simulium sp.* e *S. (Ch.) serranum* uma maior ocorrência nas larvas médias e para *S. (Inaequalium) sp.* encontrou-se ocorrência nas três categorias, embora a maior porcentagem de parasitismo tenha sido encontrada nas pequenas seguida das médias (Tabela 6).

Apesar da diferença na ocorrência de parasitismo por categoria larval entre as espécies de simúlideos, podemos observar que a porcentagem de parasitismo, para cada localidade, foi maior para as larvas médias. Esses resultados não coincidem totalmente com o relatado por Maurand 1973 (*apud* Torres *et al.*, 1991) que indicou uma relação direta entre a taxa de infecção por microsporídeos e a idade das larvas. A diferença dos resultados obtidos com o indicado por Maurand, pode-se dever a que no presente estudo de modo geral, o número total de larvas grandes por espécie de simúlideo que encontramos nos criadouros foi baixo em comparação às pequenas e médias.

Tabela 6. Ocorrência de parasitismo pelo microsporídeo *P. simulii* em larvas de simulídeos em localidades do estado de São Paulo.

Localidades (sigla)*	Espécies (sub-gênero)**	Total coletado	Total parasitado (%)	Categoria larval (%)		
				pequenas	médias	grandes
MR-LR	<i>S. (H.) rubrithorax</i>	1028	7 (0,68)	0	0,68	0
	<i>S. (G.) pruinosum</i>	603	12 (1,99)	0	0,17	1,82
	<i>S. (H.) brachycladum</i>	262	0 (0)	0	0	0
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	108	4 (3,70)	0	3,70	0
	<i>S. (Ch.) serranum</i>	42	5 (11,90)	2,38	7,14	2,38
	<i>S. (P.) sp.</i>	2	0 (0)	0	0	0
	Total (% Geral)	2045	27 (1,32)	(0,05)	(0,73)	(0,59)
MR-R	<i>S. (H.) brachycladum</i>	578	49 (8,48)	0	6,75	1,73
	<i>S. (Ch.) serranum</i>	562	275 (48,93)	19,93	23,31	5,69
	<i>S. (G.) pruinosum</i>	379	50 (13,19)	0	7,39	5,80
	<i>S. (P.) sp.</i>	18	1 (5,50)	0	5,55	0
	<i>S. (I.) sp.</i>	17	2 (11,70)	0	11,76	0
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	13	0 (0)	0	0	0
Total (% Geral)	1567	377 (24,06)	(7,15)	(12,82)	(4,08)	
LEM	<i>S. sp.</i>	1864	79 (4,24)	1,07	3,16	0
	<i>S. (I.) sp.</i>	463	52 (11,23)	6,91	3,89	0,43
	<i>S. (P.) sp.</i>	12	0 (0)	0	0	0
	<i>S. (Ch.) serranum</i>	3	2 (66,66)	0	66,66	0
Total (% Geral)	2342	133 (5,68)	(2,22)	(3,37)	(0,08)	

* ver Tabela 1 em Materiais e Métodos.

** I: *Inaequalium*; P.: *Psaraniocompsa*; G.: *Grenierella*; Ch.: *Chirostilbia*; H.: *Hemicnetha*.

A patogenicidade de um microsporídeo depende da dose infectiva (inóculo), do estágio e estágio de desenvolvimento do hospedeiro, assim como do órgão ou tecido atingido e do estado nutricional e nível de estresse (Weiser, 1963). Está relacionada também ao seu modo de invasão no hospedeiro e ao sítio de infecção. Microsporídeos instalados no intestino e na musculatura geralmente produzem infecções agudas, enquanto aqueles que ficam confinados ao tecido adiposo, causam com maior frequência infecções crônicas. Castello Branco (1991) observou *P. simulii* causando infecções crônicas ao longo do ano, apesar de promover alguns picos epizooticos nesse período.

Parasitismo por microsporídeos encontrou-se também em São Francisco de Paula/RS (SFP), estando parasitadas duas das três espécies de simulídeos: *S. (H.) rubrithorax* e *S. (Ch.) laneportoi*. Microsporídeos parasitando larvas de simulídeos foram achados

também em larvas de *S. (Ch.) pertinax* em Itapema/SC (ITA); em Santo Antônio de Atalanta/ SC (SAA), estando parasitada só uma das três espécies presentes, *S. (Psaraniocompsa)* sp.. Em Barão/RS (BAR) encontrou-se parasitadas todas as espécies presentes: *Simulium (Psaraniocompsa) auripellitum* Enderlein, 1933, *S. (Ch.) pertinax*, *S. (H.) rubrithorax* e *S. (Psaraniocompsa)* sp. Em Barra do Una/SP, onde só uma espécie das três encontradas estava parasitada: *S. (Ch.) pertinax*. Em Paulínia/SP (PAUL) encontrou-se parasitismo na única espécie presente: *S. (H.) brachycladum*. No riacho e na rampa da Serra do Japi em larvas de *S. (P.) auripellitum* e *S. (Ch.) pertinax* em SJ-LR e em *Simulium (Inaequalium) subclavibranchium* Lutz, 1910 em SJ-R; e nas duas localidades pesquisadas no estado de Paraná: Tibají (T-IU) em *S. (Ch.) serranum* e em Rolândia (ROL) em *Simulium* sp. (Tabela 3.). Nestas localidades não foi possível determinar a espécie de Microspora devido ao baixo número de exemplares parasitados e devido aos esporos em sua maioria não se encontrarem maduros.

A importância dos microsporídeos deve-se a sua patogenicidade, facilidade de dispersão e certo grau de especificidade, ou mesmo devido à sua capacidade de permanecer indefinidamente em uma população. Por isso são ideais para serem empregados no controle biológico de insetos de importância médica e econômica (MacLaughlin, 1971; Henry, 1981).

Sweeney & Becnel (1991) sustentam que é grande o potencial dos microsporídeos para o controle de dípteros aquáticos, especialmente a médio e longo prazo. A dificuldade reside na criação em massa e custos competitivos no mercado mundial. O microsporídeo *Nosema locustae* chegou a ser industrializado e comercializado para o controle de grilos e gafanhotos (Henry & Oma, 1981). A especificidade e patogenicidade garantiram bons resultados, no entanto em termos de custos, o produto tornou-se pouco competitivo frente as opções químicas.

Devemos destacar que na localidade de Leme/SP (LEM) encontramos infecção simultânea em uma larva de *S. sp.* por *P. simulii* e por um nematódeo mermitídeo. Os resultados obtidos no presente estudo coincidem com Mauram & Loubès (1978) e Torres *et al.* (1991) que assinalaram que geralmente um só patógeno se encontra na cavidade celômica de uma mesma larva devido a que a ação histopatológica de Microspora, Mermithidae e fungos do gênero *Coelomycidium*, está especialmente dirigida ao tecido

adiposo da larva, e a competição pelo substrato nutricional poderia explicar que geralmente se encontre só um destes patógenos em uma mesma larva de simulídeo. Mais raramente, pode-se achar infecção simultânea por vários desses inimigos naturais em uma só larva hospedeira. Maurand & Loubès (1978) registraram infecção por *Microspora* e *C. simulii* em uma larva de *Tetisimulium bezzi*, enquanto que Torres (1988) encontrou uma larva de *S. ignescens*, a uma altitude de 3000 metros sobre o nível do mar infetada por *P. simulii* e *C. simulii*.

Estudos similares realizados por vários autores, mostram que *P. simulii* foi registrada na região neotropical parasitando várias espécies de simulídeos (Marino *et al.*, 1980; Takaoka, 1980 e Torres *et al.*, 1991). No Brasil, os primeiros registros de microsporídeos em populações de simulídeos foram feitos por Lutz & Splendore (1908). Mais recentemente tem sido registradas as espécies *P. simulii*, *Amblyospora bracteata*, *Thelohania* sp. e *Nosema* sp. parasitando larvas de simulídeos na região sudeste do Brasil (Cordeiro & Castello Branco Jr., 1988; Castello Branco Jr. *et al.*, 1987; 1991; Castello Branco & Andrade, 1988; 1991; 1993; Castello Branco Jr., 1994). Hamada *et al.*, (1997) por sua parte registraram a espécie *A. bracteata* na região central da Amazônia. Estudos mais aprofundados poderiam determinar maiores parâmetros quanto ao uso em potencial desses organismos.

4.1.2. Parasitismo por nematódeos mermitídeos.

Entre os parasitas de larvas de simulídeos encontrados nas localidades pesquisadas estão os nematódeos da família Mermithidae. Estes parasitas se localizam enrolados dentro da parte posterior do abdome da larva ou esticados e ocupando todo a hemocele ao longo do hospedeiro (Figura 4).

Na Serra do Japi/SP encontrou-se parasitismo por *Isomermis* sp. (Nematoda: Mermithidae) durante o período de maio de 1996 a maio de 1998, obtendo-se a maior porcentagem de parasitismo na rampa de cimento da saída do lago (SJ-R) (6,65%) onde observou-se altos níveis de parasitismo em quatro das cinco espécies presentes: *S. (Ch.) pertinax* (45,83%), *S. (I.) subnigrum* (9,89%), *S. (P.) auripellitum* (6,90) e

S. (G.) pruinosum (5,04%). No riacho desta mesma localidade (SJ-LR) observou-se também parasitismo por *Isomermis* sp. (4,88%), estando parasitadas todas as espécies presentes: *S. (Ch.) pertinax* (11,36%), *S. (I.) subnigrum* (9,51%), *S. (P.) auripellitum* (2,13%), *S. (G.) pruinosum* (1,55%), *S. (I.) subclavibranchium* (0,76%) (Tabela 7).

Devemos destacar que na última coleta realizada na Serra do Japi, foi encontrado no leito do riacho desta localidade um nematódeo mermitídeo de outra espécie que se encontrava parasitando uma larva média de *S. (I.) subnigrum*.

Os mermitídeos de simulídeos embora estejam amplamente distribuídos geograficamente, com frequência ocorrem em correntes de água de uma área particular. Quando uma ou mais espécies de mermitídeos co-habitam em uma área, uma delas usualmente predomina. Em Newfoundland, Canada por exemplo, *Gastromermis viridis*, *Isomermis wisconsinensis* e *Mesomermis fluminalis* freqüentemente coexistem, mas a última é muito mais comum e ocorre em maior número de correntes d'água que as outras (Ezenwa, 1974). Outros registros de diferentes espécies de mermitídeos em simpatria foram feitos por Camino (1991) na provincia de Tucumán na Argentina, este autor encontrou juntas as espécies *Mesomermis nortensis*, *Mesomermis* sp. e *Gastromermis* sp., parasitando larvas de *Simulium lachillei* Paterson & Shannon, 1927.

Parasitismo por nematódeos mermitídeos foi encontrado em outras localidades do estado de São Paulo. Na localidade de Barra do Una (BU) observou-se parasitismo em larvas de *S. (Ch.) pertinax*; em Morungaba também observou-se parasitismo em *S. (Ch.) pertinax* em MR-LR e em *S. (H.) brachycladum* em MR-R e em Leme (LEM) foi observado parasitismo em *S. (Inaequalium)* sp. e em *Simulium* sp. Nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais foi achado também parasitismo por mermitídeos em larvas de simulídeos. Em São Francisco de Paula/RS (SFP) observou-se parasitismo em larvas de *S. (Ch.) laneportoi*; em Barão/RS (BAR) foi achado parasitismo em três das quatro espécies presentes: *S. (P.) auripellitum*, *S. (Psaraniocompsa)* sp. e *S. (Ch.) pertinax*. Na localidade de Tibají/PR também achou-se parasitismo, mas só em larvas de *S. (Ch.) pertinax*. Em Santo Antônio de Atalanta/SC (SAA) encontraram-se parasitadas todas as espécies presentes: *S. (Psaraniocompsa)* sp., *S. (Inaequalium)* sp. e *S. (Ch.) pertinax*. Em Montes Verdes/MG (MV) achou-se também parasitismo em larvas de *S. (Psaraniocompsa)* sp. a uma altitude de 1650 metros (Tabela 3).



Figura 4. Larvas de simulídeos infectadas por *Isomermis sp.*
A seta indica o mermítídeo no interior da larva. 6,25 x.

Tabela 7. Ocorrência total de parasitismo pelo mermitídeo *Isomermis* sp. em larvas de simulídeos na Serra do Japi (SJ-LR e SJ-R).

Localidades (sigla)*	Espécies (sub-gênero)**	Total coletado	Total parasitado (%)	Categoria larval (%)		
				pequenas	médias	grandes
SJ-LR	<i>S. (I.) subnigrum</i>	915	87 (9,51)	0,22	7,54	1,75
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	892	19 (2,13)	0	2,02	0,11
	<i>S. (G.) pruinatum</i>	452	7 (1,55)	0	1,11	0,44
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	395	3 (0,76)	0	0,76	0
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	44	5 (11,36)	0	11,36	0
	Total (% Geral)	2475	121 (4,88)	(0,77)	(4,04)	(0,08)
SJ-R	<i>S. (G.) pruinatum</i>	674	34 (5,04)	0,15	4,75	0,15
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	91	9 (9,89)	0	9,89	0
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	24	11 (45,83)	0	45,83	0
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	38	2 (6,90)	0	6,90	0
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	15	0 (0)	0	0	0
	Total (% Geral)	842	56 (6,65)	(0,12)	(6,41)	(0,12)

* ver Tabela 1 em Materiais e Métodos.

** *I.*: *Inaequalium*; *P.*: *Psaraniocompsa*; *G.*: *Grenierella*; *Ch.*: *Chirostilbia*.

Para as localidades anteriormente mencionadas não foi possível determinar o gênero e a espécie de mermitídeo presente pois não obtivemos exemplares adultos, que são os que aportam a maior quantidade de caracteres diagnósticos a estes níveis; não obstante pode-se sugerir que na localidade de Tibaji/PR e o mermitídeo achado na última coleta na Serra do Japi/SP provavelmente correspondam ao gênero *Gastromermis* devido à cor esverdeada que apresentam os pós-parasitas vivos e ao apêndice caudal reto e comprido, segundo Rubtsov (1981) característico deste gênero

Ocorrência em baixa frequência por nematódeos mermitídeos em simulídeos foi registrada por vários autores no mundo. Ezenwa (1973), ao examinar 3144 larvas de cinco espécies de simulídeos na Península do Labrador, Canadá, encontrou uma incidência de 11,2%. Takaoka (1980), ao examinar 23 346 larvas de simulídeos de Guatemala, indica uma incidência de 2,4%. Walsh *et al.* (1981) no entanto, sugerem a possibilidade de se suspender a aplicação de larvicidas químicos no rio Volta (área de oncocercoses na África ocidental) durante os meses de outubro e novembro devido à alta incidência de mermitídeos durante nesse período.

Estudos feitos por outros pesquisadores no Brasil têm registrado a ocorrência de parasitismo por nematódeos mermitídeos em larvas de simulídeos na região sudeste do país. Castello Branco Jr. (1991) registrou a ocorrência de *Gastromermis viridis* (Nematoda: Mermithidae) em larvas de *S. (Ch.) pertinax*, na localidade de Morungaba, estado de São Paulo. Outros registros de mermitídeos em larvas de borrachudos no sul e sudeste tem sido feitos por outros pesquisadores (Castello Branco Jr. & Andrade, 1988; Castello Branco Jr. *et al.*, 1987; 1993; Fetzner & Strider, 1996; Ambrós *et al.*, 1996).

Nas larvas de simulídeos parasitadas por nematódeos observou-se geralmente um nematódeo por larva. Os pós-parasitas obtidos ao emergirem das larvas hospedeiras foram fêmeas, com exceção das coletas realizadas na Serra do Japi nos meses de outubro de 1996, julho de 1997, agosto de 1997 e setembro de 1997 e nas localidades do estado do Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula (SFP) e Barão (BAR), onde foram encontradas larvas de simulídeos parasitadas por vários mermitídeos, obtendo-se então nematódeos fêmeas e machos. Isto concorda com minhas observações pessoais feitas em Cuba. Para larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) infectadas com apenas um nematódeo de *Romanomermis culicivorax*, obtiveram-se geralmente pós-parasitas fêmeas, mas de larvas superparasitadas emergiram em maior quantidade pós-parasitas machos. Petersen (1972) também indicou que a proporção de machos em relação às fêmeas de *R. culicivorax* cresce ao aumentar o número de parasitas por hospedeiro. Por outra parte, Paine & Mullens (1994) observaram o mesmo fato para o mermitídeo *Heleidomermis magnapula*, parasitando larvas de *Culicoides variipennis* (Ceratopogonidae).

A análise dos dados de ocorrência de parasitismo por *Isomermis sp.* pela prova de χ^2 ($\alpha=0,05$), revelou para os dois microambientes pesquisados na Serra do Japi (leito do riacho e rampa de cimento na saída do lago) que a ocorrência de parasitismo por categoria larval é independente da espécie de simulídeo, o que indica que não existem diferenças significativas entre as espécies. Para as coletas obtidas no leito do riacho (SJ-LR), para as cinco espécies presentes [*S. (I.) subnigrum*, *S. (P.) auripellitum*, *S. (I.) subclavibranchium*, *S. (G.) pruinosum* e *S. (Ch.) pertinax*] observou-se as maiores ocorrências de parasitismo em larvas médias. Na região da rampa de cimento (SJ-R), para as quatro espécies parasitadas [*S. (G.) pruinosum*, *S. (I.) subclavibranchium*,

S. (Ch.) pertinax e *S. (P.) auripellitum*] as maiores ocorrências de parasitismo também foram obtidas em larvas médias (Tabela 7). O fato das maiores ocorrências de parasitismo por *Isomermis* sp. terem sido encontradas em larvas da categoria média e que os mermitídeos encontravam-se bem desenvolvidos, indica que as formas preparasíticas teriam penetrado nos primeiros estádios de desenvolvimento do hospedeiro.

Pesquisas feitas por Santamarina (1991), indicam que larvas de primeiro e segundo estágio de *C. quinquefasciatus*, em que o tegumento é menos grosso devido à menor quantidade de quitina, são mais susceptíveis ao ataque de larvas preparasíticas de *R. culicivorax* que as de terceiro e quarto estágio. Estudos similares realizados por Bailey & Gordon (1977) em 83 cursos d'água de Newfoundland, Canadá indicam que *Prosimulium mixtum*, *P. fuscum* e *Simulium venustum* foram os hospedeiros predominantes de *M. fluminalis*, mas a porcentagem de infecção por este mermitídeo em larvas de estádios tardios foi geralmente baixa. Por outra parte Colbo & Porter (1980) indicaram que a penetração dos preparasíticos de mermitídeos no hospedeiro ocorre principalmente em estádios iniciais de larvas de simulídeos.

4.2. Prevalência do nematódeo mermitídeo *Isomermis* sp. e de protozoários microsporídeos em larvas de simulídeos na Serra do Japi.

Com relação as características dos criadouros onde foi realizado o estudo sobre prevalência do nematódeo mermitídeo *Isomermis* sp. e protozoários microsporídeos em larvas de simulídeos na Serra do Japi/SP podemos dizer que a temperatura ambiental (12-24°C, com média de 18°C), a temperatura da água (12-20°C, com média de 16°C) e sua velocidade (50-128 cm/s, com média de 89 cm/s no riacho e 93-270 cm/s, com média de 181,5 cm/s na rampa) tiveram grande variação ao longo do período de estudo (Tabela 2). Esta variação deve-se a mudança das estações do ano, aumentando assim as temperaturas e velocidade da água durante o verão devido a aumento das precipitações.

O valor médio de pH das águas do leito do riacho e da rampa estudados foi de 6,2 que está dentro da faixa de pH na qual os mermitídeos são infectivos; esta faixa varia de 3,6 a 8,6 (Brown & Platzer, 1978).

As Tabelas 8 e 9 mostra a taxa de prevalência de parasitismo pelo mermitídeo *Isomermis* sp. durante o período de estudo nos dois microambientes do riacho estudado na Serra do Japi, no leito natural do riacho (SJ-LR) e na rampa de cimento à saída do lago (SJ-R). Pode-se observar que a ocorrência de mermitídeos variou de 0,86% a 20% no leito natural e de 1,28 a 21,30% na rampa de cimento. A maior ocorrência de parasitismo por mermitídeos foi obtida no mês de maio de 1996 (na rampa) e em setembro de 1997 (no leito natural), que correspondem respectivamente aos meses do início e fim do inverno. Observou-se em geral, ocorrência muito baixa de parasitismo durante os meses de verão, período em que há um aumento nas temperaturas e nas precipitações. Não encontrou-se parasitismo no leito natural (SJ-LR) nos meses de outubro de 1996 (não haviam larvas de simulídeos), janeiro e novembro de 1997 (meses de verão) enquanto que na região da rampa, não encontrou-se parasitismo nos meses de fevereiro (não haviam larvas de simulídeos) e abril, meses de fim do verão (Figura 5).

Alguns autores registraram que em regiões onde ocorrem baixas temperaturas a ocorrência de mermitídeos é geralmente elevada porque as baixas temperaturas causam uma diminuição da movimentação das larvas de simulídeos e em geral de suas respostas comportamentais ao ambiente, permitindo que as larvas infectivas ou preparasíticas penetrem mais facilmente perfurando o tegumento do hospedeiro que não consegue evitá-las (Anderson & Dicke, 1960; Rubtsov, 1963). Outro fator que pode ter influenciado esta distribuição da ocorrência de parasitismo poderia ser a variação no volume e na velocidade da água. O aumento das precipitações durante o verão tem como consequência maior vazão, levando a maior velocidade da corrente de água, dificultando o deslocamento e ataque pelas formas preparasíticas e reduzindo assim a ocorrência do nematódeo nesses períodos do ano. Estudos realizados por Castello Branco Jr. (1994) em Morungaba/SP, indicam que a ocorrência do mermitídeo *Gastromermis viridis* foi maior nos meses de inverno, cuja vazão do riacho foi a menor do período de estudo. Este autor indica que não observou ocorrência de *G. viridis* nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. Weiser (1964) encontrou baixa incidência de mermitídeos em larvas de *S. muiscorum*, que ocorrem em maior quantidade em sítios de correntes rápidas, bem como alta incidência de mermitídeos em larvas de *S. ignescens*, que tem preferência pelas correntes onde a velocidade da água não é muito alta. Crosskey (1990), relata que realmente a prevalência

de mermitídeos em populações larvais de simulídeos varia com as estações do ano, além de variar para as velocidades das correntes e mesmo para os diferentes pontos de uma corrente, como também varia com a espécie hospedeira de simulídeo. A prevalência de mermitídeos em seus hospedeiros pode ser muito alta. Colbo & Porter (1980), encontraram prevalências de 8% a 68% de mermitídeos não identificados do complexo *S. venustum* durante os meses de maio a junho no Canadá.

Além do parasitismo pelo nematódeo mermitídeo em larvas de simulídeos durante o período de maio de 1996 a maio de 1998, foi encontrado parasitismo por protozoários microsporídeos (Tabelas 8 e 9). A prevalência de microsporídeos ao longo desse período foi muito baixa (Figura 6), variando de 0,15% a 1,64% para o leito do riacho (SJ-LR) e no outro microambiente, a rampa de cimento (SJ-R) só foi encontrado parasitismo na coleta de fevereiro de 1998 (0,54% como total) em uma larva de *S. (I.) subclavibranchium*. No leito do riacho as maiores ocorrências foram observadas em maio de 1996 (1,64%) e em agosto de 1997, que correspondem a início e final do inverno, respectivamente. Esses meses coincidem com altas ocorrências de parasitismo por *Isomermis* sp. Devemos destacar também que ao longo do período só duas espécies se encontraram parasitadas em SJ-LR, *S. (Ch.) pertinax* e *S. (P.) auripellitum*.

É conhecido que em populações de simulídeos, as infecções por microsporídeos ocorrem geralmente em níveis abaixo de 1%, entretanto não são raros os casos onde a prevalência chega a 30% ou 50% (Gassouma, 1972; Weiser & Undeen, 1981; Maddox, 1987; Castello Branco Jr, 1991).

Os fatores que influenciam o estudo das doenças de insetos podem ser abordados sob três aspectos: quanto ao patógeno, ao hospedeiro e ao ambiente. O conhecimento da importância de cada um desses aspectos leva à compreensão da dinâmica de uma doença (Castello Branco Jr., 1998).

As propriedades mais significativas quanto ao patógeno em termos epizootiológicos, são: patogenicidade, virulência, capacidade de sobrevivência ou de persistência no ambiente e capacidade de dispersão.

Tabela 8. Parasitismos por microsporídeos e nematódeos mermitídeos nas espécies de simúlídeos presentes durante o período de estudo no leito do riacho na Serra do Japi (SJ-LR).

Datas de coleta	Espécies (sub-gênero) *	Total coletado	com microsporídeos		com nematódeos	
			No.	%	No.	%
maio/96	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	29	1	3,45	4	13,79
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	21	0	0	2	9,52
	<i>S. (G.) pruinsum</i>	11	0	0	2	18,18
	Total (% Geral)	61	1	(1,64)	8	(13,11)
janeiro/97	<i>S. (I.) subnigrum</i>	46	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	33	0	0	0	0
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	17	1	5,88	0	0
	<i>S. (G.) pruinsum</i>	1	0	0	0	0
	Total (% Geral)	93	1	(1,03)	0	(0)
fevereiro/97	<i>S. (I.) subnigrum</i>	49	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	48	0	0	0	0
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	17	0	0	1	5,88
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	2	0	0	0	0
	Total (% Geral)	116	0	(0)	1	(0,86)
abril/97	<i>S. (G.) pruinsum</i>	375	0	0	2	0,53
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	103	0	0	1	0,97
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	64	0	0	1	1,56
	Total (% Geral)	542	0	(0)	4	(0,74)
maio/97	<i>S. (P.) auripellitum</i>	173	1	0,58	3	1,73
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	55	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	44	0	0	2	4,55
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	9	0	0	1	11,11
	Total (% Geral)	281	1	(0,35)	6	(2,14)
junho/97	<i>S. (P.) auripellitum</i>	224	0	0	3	1,34
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	25	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	23	0	0	0	0
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	1	0	0	0	0
	Total (% Geral)	273	0	(0)	3	(1,10)
julho/97	<i>S. (I.) subnigrum</i>	419	0	0	58	13,84
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	161	0	0	2	1,24
	<i>S. (G.) pruinsum</i>	61	0	0	5	8,20
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	22	0	0	3	13,64
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	3	1	33,33	0	0
	Total (% Geral)	666	1	(0,15)	68	(10,21)

Tabela 8. (continuação).

Datas de coleta	Espécies (sub-gênero) *	Total coletado	com microsporídeos		com nematódeos	
			No.	%	No.	%
agosto/97	<i>S. (P.) auripellitum</i>	139	3	2,16	2	1,44
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	54	0	0	11	20,37
	<i>S. (G.) pruinosum</i>	4	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	1	0	0	0	0
	Total (% Geral)	198	3	(1,52)	13	(6,57)
setembro/97	<i>S. (I.) subnigrum</i>	36	0	0	10	27,77
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	32	0	0	4	12,5
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	2	0	0	0	0
	Total (% Geral)	70	0	(0)	14	(20)
novembro/97	<i>S. (P.) auripellitum</i>	62	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	17	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	4	0	0	0	0
	Total (Geral)	83	0	(0)	0	(0)
fevereiro/98	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	43	0	0	0	0
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	37	0	0	1	2,70
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	8	0	0	0	0
	Total (% Geral)	88	0	(0)	1	(1,14)
maio/98	<i>S. (P.) auripellitum</i>	105	1	0,95	1	0,95
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	93	0	0	3	3,23
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	25	0	0	1	4
	Total (% Geral)	223	1	(0,45)	5	(2,24)

* I: *Inaequalium*; P: *Psaraniocompsa*; G: *Grenierella*; Ch: *Chirostilbia*.

Tabela 9. Parasitismos por microsporídeos e nematódeos mermitídeos nas espécies de simulídeos presentes durante o período de estudo na rampa de cimento à jusante do lago na Serra do Japi (SJ-R).

Datas de coleta	Espécies (sub-gênero) *	Total coletado	com microsporídeos		com nematódeos	
			No.	%	No.	%
maio/96	<i>S. (G.) pruinosum</i>	119	0	0	14	11,7
	<i>S. (Ch.) pertinax</i>	24	0	0	11	45,8
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	7	0	0	7	100
	Total (Geral)	150	0	(0)	32	(21,3)
outubro/96	<i>S. (G.) pruinosum</i>	316	0	0	18	5,70
janeiro/97	<i>S. (I.) subnigrum</i>	63	0	0	1	1,59
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	15	0	0	0	0
	Total (% Geral)	78	0	(0)	1	(1,28)
abril/97	<i>S. (G.) pruinosum</i>	68	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	11	0	0	0	0
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	3	0	0	0	0
	Total (% Geral)	82	0	(0)	0	(0)
agosto/97	<i>S. (I.) subnigrum</i>	3	0	0	0	0
setembro/97	<i>S. (P.) auripellitum</i>	4	0	0	0	0
novembro/97	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	5	0	0	0	0
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	2	0	0	1	50
	Total (% Geral)	7	0	(0)	1	(14,29)
fevereiro/98	<i>S. (G.) pruinosum</i>	171	0	0	2	1,17
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	5	1	20	0	0
	<i>S. (P.) auripellitum</i>	5	0	0	1	20
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	4	0	0	0	0
	Total (Geral)	185	1	(0,54)	3	(1,62)
maio/98	<i>S. (P.) auripellitum</i>	9	0	0	0	0
	<i>S. (I.) subnigrum</i>	6	0	0	1	1,66
	<i>S. (I.) subclavibranchium</i>	5	0	0	0	0
	Total (Geral)	20	0	(0)	1	(5)

* I: *Inaequalium*; P: *Psaraniocompsa*; G: *Grenierella*; Ch: *Chirostilbia*.

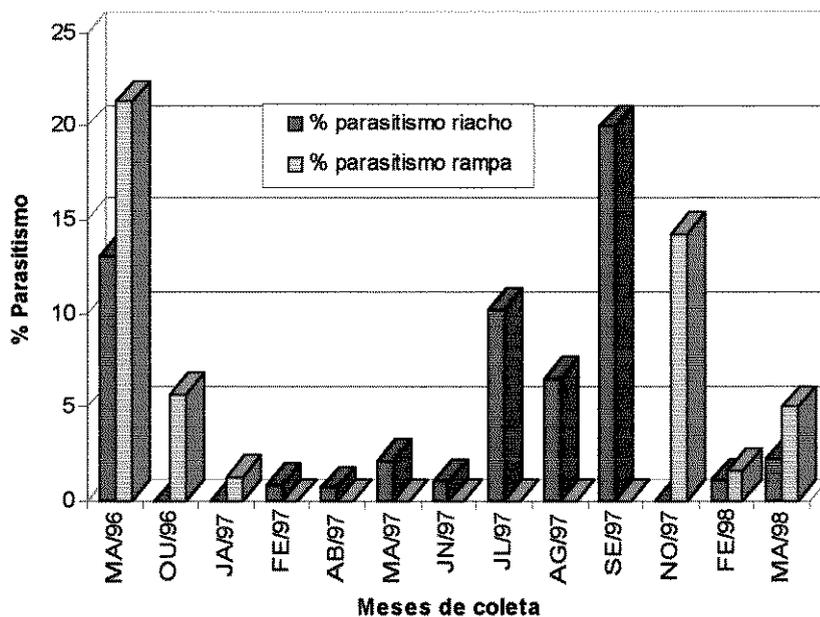


Figura 5. Prevalência de parasitismo pelo mermitídeo *Isomermis sp.* em larvas de simuliídeos no leito natural do riacho e na rampa na Serra do Japi (SJ-LR e SJ-R) durante o período de estudo.

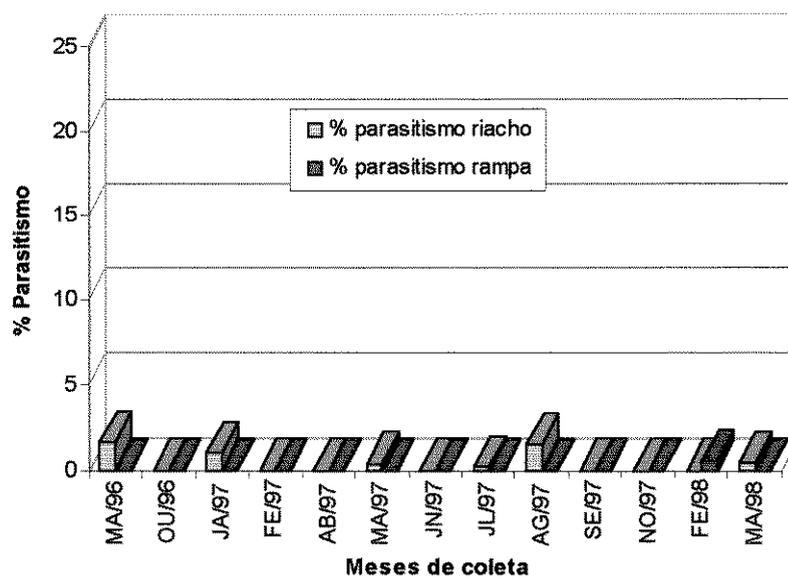


Figura 6. Prevalência de parasitismo por microsporídeos em larvas de simuliídeos no leito natural do riacho e na rampa na Serra do Japi (SJ-LR e SJ-R) durante o período de estudo.

Aparentemente não existem registros quanto à diferença de virulência entre linhagens (ou isolados) de microsporídeos, o que se deve à falta de métodos para se avaliar as espécies desse grupo (Tanada, 1976).

Quanto a persistência e longevidade dos esporos, Kramer (1970) assinalou que essa questão era desconhecida para 95% das espécies descritas e a maioria dos estudos feitos até o momento são de laboratório. A longevidade dos esporos varia de espécie para espécie e de situação para situação. Esporos de *Nosema algerae* tornam-se inviáveis após 5 minutos de dessecação (Maddox, 1973), enquanto seus esporos sobrevivem no solo por pelo menos 12 anos (Weiser, 1956, *apud* Tanada, 1976). A persistência no hospedeiro também pode ser importante, temos por exemplo algumas espécies do gênero *Thelohania* que hibernam dentro de pernilongos univoltinos (Kellen *et al.*, 1965).

Essa escassez de estudos sobre a persistência de esporos de microsporídeos no ambiente implica em pouco conhecimento sobre sua dispersão. Sabe-se que o vento, a chuva e os rios podem dispersar seus esporos. Os inimigos naturais, tais como predadores e parasitóides também dispersam os esporos. Em ambientes aquáticos os próprios indivíduos infectados liberam esporos ao morrer, favorecendo a infecção de outros hospedeiros via ingestão (Castello Branco Jr., 1991).

Em relação à epizootiologia de microsporídeos, um dos fatores de grande importância para a compreensão da dinâmica da doença é seu modo de transmissão. Para os insetos com larvas aquáticas como é o caso dos simulídeos, os microsporídeos podem ser transmitidos por via oral ou por via transovariana ou transovigênica (Maddox, 1987). A transmissão vertical tem sido demonstrada em culicídeos (Adreadis, 1990) e em simulídeos (Undeen, 1981). Castello Branco Jr. (1991) demonstrou a ocorrência de transmissão horizontal como mecanismo de manutenção da doença nas populações hospedeiras de *S. pertinax*. Por outra parte, White *et al.* (1994) observaram no laboratório, transmissão horizontal de *Amblyospora opacita* entre o mosquito *Culex territans* e o copépodo *Paracyclops chiltoni*.

O impacto das microsporidioses e infecções por nematódeos mermitídeos em simulídeos parece ser significativo, a ponto de estimular mais estudos com o fim de se compreender melhor sua dinâmica e avaliar seu potencial como agentes de controle biológico, natural e aplicado.

4.3. Variação da densidade larval relativa das espécies de simúlideo no leito natural do riacho e na rampa da Serra do Japi.

As Figuras 7 e 8 mostram a variação da densidade relativa das larvas coletadas por espécie de simúlideo no riacho e na rampa da Serra do Japi, durante o período de maio de 1996 a fevereiro de 1998. Pode-se observar que para o leito do riacho, a densidade relativa de larvas de *S. (I.) subnigrum* variou no mínimo de 0,87% a máximo de 45,79% , ocorrendo este máximo no mês de julho, que coincide com a estação de inverno e quando se obteve uma alta porcentagem geral de parasitismo por mermitídeos (10,21%) (Tabela 8). Um padrão semelhante foi encontrado para *S. (I.) subclavibranchium*, que também ocorreu em baixa densidade durante todo o período estudado, incrementando-se em número também no mês de julho de 1997. Para *S. (G.) pruinosum* observamos a maior densidade relativa em abril de 1997 (estação de outono), podendo-se coletar 375 larvas (82,96%) incluindo só pequenas e médias. Para *S. (P.) auripellitum* podem-se observar dois picos de maior ocorrência relativa, um em maio de 1997 e outro em meados de junho do mesmo ano (início do inverno). *S. (Ch.) pertinax* manteve-se durante todo o período em baixa densidade relativa, embora em maio de 1996 pode-se coletar um maior número de larvas (29/65,91%) desta espécie, data que também coincide com uma alta porcentagem geral de parasitismo por mermitídeos (13,11%) (Tabela 8), devido principalmente à alta ocorrência de parasitismo nesta espécie (13,73%) e corresponde também com a maior porcentagem de parasitismo por microsporídeos do período (1,64%), sendo *S. pertinax* a única espécie parasitada por este patógeno nesta coleta (Tabela 8).

Na rampa de cimento à saída do lago da Serra do Japi podemos coletar durante o estudo, as mesmas espécies que no riacho: *S. (I.) subnigrum*, *S. (I.) subclavibranchium*, *S. (G.) pruinosum*, *S. (P.) auripellitum* e *S. (Ch.) pertinax*. Para *S. (G.) pruinosum*, no entanto observou-se um pico populacional (316 larvas/46,88%) em outubro de 1996 (primavera) (Figura 8). Nesta data só esta espécie de simúlideo estava presente e tinha uma ocorrência de parasitismo por mermitídeos de 5,7%. Podemos observar novamente

um aumento da densidade larval relativa desta espécie em fevereiro de 1998 (estação do verão). No caso de *S. (I.) subnigrum* e *S. (P.) auripellitum* o maior número de indivíduos foi encontrado em janeiro de 1997 (estação de verão), onde a porcentagem de parasitismo foi baixa. *S. (Ch.) pertinax* manteve-se em baixa quantidade por todo o período de estudo, mas o maior número de larvas coletadas se obteve em 13 de maio de 1996, coincidindo com a maior porcentagem de parasitismo por mermitídeos (21,3%) observada nesta localidade (Tabela 9). No caso de *S. (I.) subclavibranchium*, esta espécie só foi encontrada a partir de novembro de 1997, mantendo-se na mesma densidade durante as próximas coletas, além disso devemos destacar que a porcentagem de parasitismo encontrada na rampa corresponde a uma larva desta espécie (Tabela 9). A partir da coleta de abril de 1997 não foram encontradas mais larvas de simulídeos nesse microambiente, o que pode-se dever a que a rampa encontrava-se cheia de pupas de tricópteros hydroptilídeos, densamente aderidos ao substrato. A partir da coleta de agosto de 1997, começaram a se encontrar larvas de simulídeos nesse sítio, primeiro sob folhas, e já na coleta de fevereiro de 1998, foram coletadas sob folhas e na própria rampa de cimento. O parasitismo por *Isomermis* sp. foi novamente observado a partir da coleta de novembro de 1997, embora em baixa porcentagem (Figura 5).

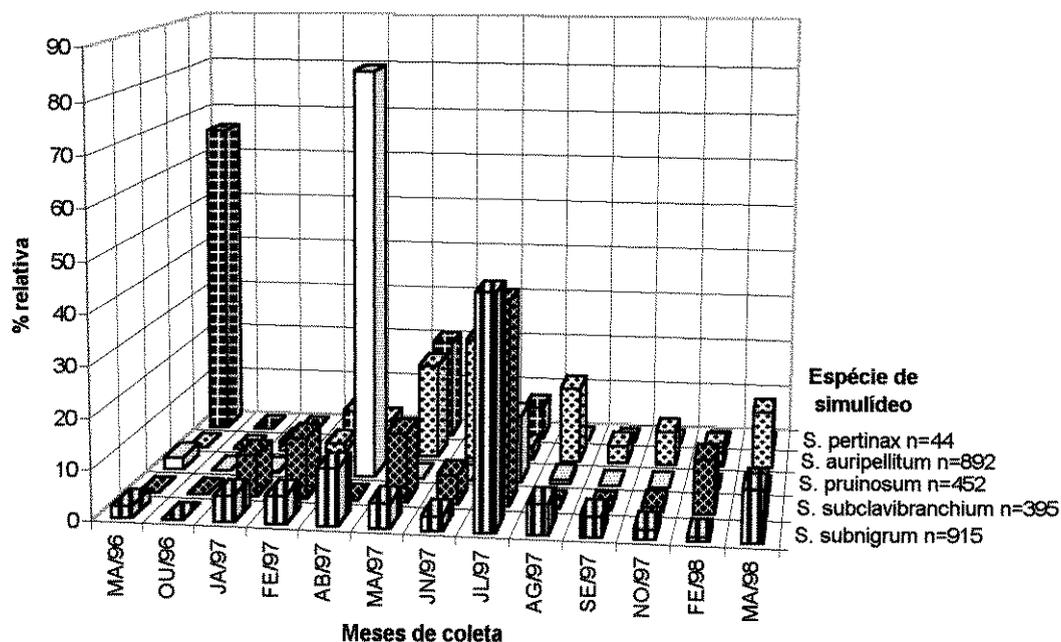


Figura 7. Densidade relativa de diferentes espécies de simúlideos coletados no leito natural do riacho da Serra do Japi (SJ-LR) durante o período de estudo.

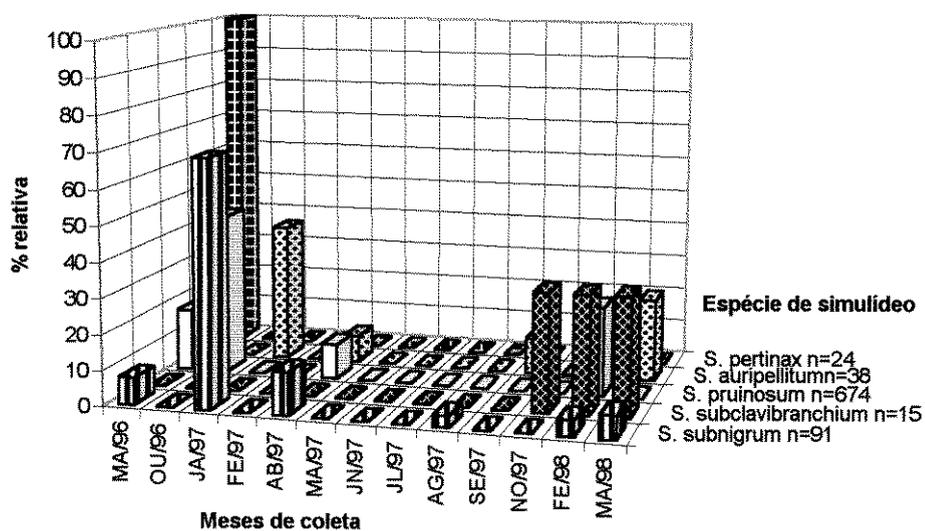


Figura 8. Densidade relativa de diferentes espécies de simúlideos coletados na rampa da Serra do Japi (SJ-R) durante o período de estudo.

A biota dos sistemas aquáticos em ambientes lóticos está sujeita a variações sazonais que podem alterar sua dinâmica populacional. Fatores abióticos como a velocidade da corrente de água e a temperatura, e fatores bióticos como a competição pelo substrato de fixação e a fuga de predadores podem influir na distribuição das larvas de simulídeos, provocando a migração das mesmas. (Waters, 1972; Crosskey, 1990). No presente estudo pode-se comprovar as variações da densidade larval relativa por espécie de simulídeo ao longo do período de estudo para os dois microambientes pesquisados na Serra do Japi, observando-se um pico populacional para cada espécie em determinada época do ano, sendo o mesmo diferente para cada microambiente. Este pico populacional na população hospedeira às vezes coincide com um pico do parasita. Apenas a densidade elevada de uma população de insetos não leva à ocorrência de uma doença. Outros fatores, como susceptibilidade da população, hábitos do inseto, características do patógeno, potencial de inóculo e condições de clima, também são determinantes para o desencadeamento das epizootias.

Epizootias são mais evidentes nas altas densidades populacionais dos hospedeiros (Watanabe, 1987). Nessas condições, aumenta a probabilidade de contato entre o inseto e as fontes de inóculo e também entre os indivíduos doentes e sadios da população. A competição pelo alimento pode levar o inseto a um estresse de alimentação, o que, normalmente, resulta em maior suscetibilidade do mesmo, aumentando o número de casos da doença e, conseqüentemente, sendo maiores as chances de ocorrência de epizootia (Alves & Lecuona, 1998).

4.4. Criação das formas de vida livre de *Isomermis* sp. no laboratório.

Com relação aos estudos de criação dos mermitídeos no laboratório pode-se observar diferentes resultados após a inundação dos recipientes (Figura 9). Na primeira cultura, surgiram formas preparasíticas quando a inundação foi feita cinco, sete e oito semanas depois de serem colocados os pós-parasitas (15 fêmeas e 3 machos). O cálculo mediante o método de diluição volumétrica revelou que na inundação feita na quinta semana obteve-se 561 preparasíticos, na sétima semana 495 preparasíticos e na oitava

semana 1020 preparasíticos. Na cultura 2 que continha 4 fêmeas e 9 machos, após a inundação, na sexta semana obtiveram-se 2527 preparasíticos, na oitava semana 340 preparasíticos e na semana dez não foram encontrados preparasíticos na cultura. Na cultura 3 que continha 2 fêmeas e 3 machos após a inundação na sexta semana se obtiveram 1369 preparasíticos. Na cultura 4, contendo 12 fêmeas e 3 machos, após a inundação na oitava semana se obtiveram 1620 preparasíticos. Com exceção das culturas 1 e 4 que não foram inundadas na sexta semana, podemos observar que tanto na cultura 2 como na cultura 3, foi esta a semana em que se obteve o maior número de preparasíticos. Para a cultura 4 que só foi inundada na oitava semana, 95% dos preparasíticos obtidos encontravam-se inativos. Ao serem inundadas na décima semana, nenhuma das culturas permitiu a obtenção de preparasíticos.

Estudos realizados por Ambrós & Santamarina (1994; 1995) com os nematódeos mermitídeos *Romanomermis iyengari* Welch, 1964 e *R. culicivorax*, parasitas de culicídeos, mostraram que a sexta semana foi a melhor para se inundar as culturas e se obter um maior número de preparasíticos, que após esse tempo, já completaram o seu desenvolvimento embrionário. Assim, na medida que vai passando o tempo, as larvas preparasíticas vão eclodindo pela própria umidade que contém a cultura e se mantêm movimentando até irem perdendo a energia e ficarem inativas.

Os resultados obtidos com relação a criação de formas de vida livre de mermitídeos no laboratório indicam que os pós-parasitas colocados no meio de areia úmida a uma temperatura de 17°C se desenvolveram com sucesso até adultos, copularam e ovipuseram, emergindo desses ovos os preparasíticos.

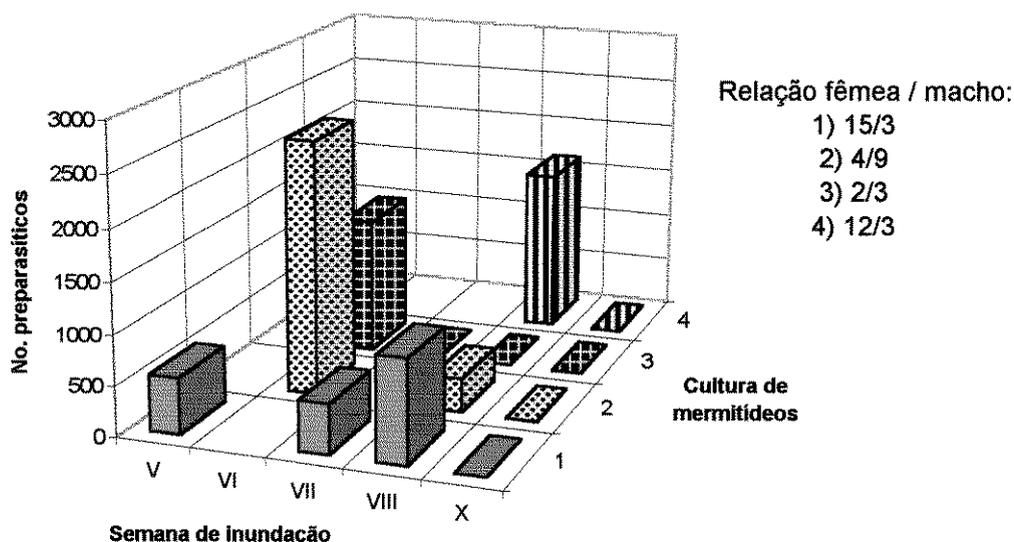


Figura 9. Quantidade de preparasíticos obtidos para quatro culturas em relação às semanas de inundação.

4.5. Observação do processo de muda das formas pós-parasitas de *Isomermis* sp. no laboratório.

Ao colocar os pós-parasitas fêmeas de *Isomermis* sp. coletados na Serra do Japi, em um meio de água destilada à uma temperatura de 22°C a 24°C, observou-se que estas começaram mudar para adultos dez dias depois de terem emergido das larvas de simulídeos. O processo de muda da cutícula do pós-parasita iniciou seu desprendimento pela região caudal. Nos trópicos têm sido feito poucos estudos com relação a muda da etapa pós-parasita a adulta de nematódeos da família Mermithidae. Acero (1991) registrou para nematódeos de simulídeos da região de Chisaca, Colômbia, um tempo de dois meses para que aconteça a muda de pós-parasitas a adultos de vida livre, à uma temperatura de 8°C a 10 °C. Estudos realizados por Ambrós & Santamarina (1994) para *R. culicivorax* relatam que a muda de pós-parasitas a adultos ocorre dez dias após terem emergido das larvas de pernilongos, à uma temperatura de 24-27°C. Em nosso estudo a diferença

encontrada em relação ao tempo de muda relatado por Acero (1991), pode-se dever principalmente em relação à temperatura menor em que foram realizados seus estudos. Uma vez que esse mesmo autor indica que o tempo de muda e o ciclo de vida em geral destes mermitídeos depende inversamente da temperatura.

Deve-se destacar que foram realizadas várias tentativas para a obtenção da muda dos pós-parasitas a adultos, devido à contaminação dos mesmos por fungos Saprolegniales Oomycetos. Outros registros de micoses têm sido feitos por Stirling & Platzer (1978) em *R. culicivora*. Eles observaram que este mermitídeo era altamente susceptível à contaminação pelo fungo Chitridiomyceto *Catenaria anguillulae*, encontrando-se até 90% dos pós-parasitas infectados. O ajuste do pH nas criações ou um pequeno período de congelamento foram as melhores medidas de controle para essa micose (Platzer & Brown, 1976; Platzer, 1978).

4.6. Criação de hospedeiros alternativos.

Logrou-se realizar a criação de *C. quinquefasciatus* utilizando água do próprio criadouro para as larvas com farinha de fígado para sua alimentação. A solução de mel a 10% foi usada para alimentar os adultos machos e ratos recém nascidos para a alimentação das fêmeas adultas, com sucesso.

Com relação as tentativas de criação de quironomídeos e psicodídeos, as larvas coletadas em pneus e banheiros residenciais uma vez trasladadas ao laboratório morreram poucos dias depois de serem colocadas tanto em água do próprio criadouro, como em água destilada ou água de torneira. A criação de quironomídeos, foi somente conseguida ao ar livre, na calha que continha água da torneira até uma altura de 7 cm e matéria orgânica, na forma de 0,5 Kg de grama cortada.

Estes resultados indicam que psicodídeos possivelmente não seria um bom grupo de insetos para ser utilizado como possível hospedeiro alternativo de *Isomermis* sp. devido a dificuldade de criação destes insetos.

4.7. Avaliação de *Isomermis* sp. em hospedeiros alternativos.

Com relação às provas realizadas no laboratório para avaliar *Isomermis* sp. em hospedeiros alternativos podemos dizer que nos grupos testados: *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, Chironomidae e Ephydriidae, não foram encontrados mermitídeos no interior das larvas e pupas assim como dos adultos que emergiam, após realizar a dissecação dos mesmos; embora foram obtidas altas porcentagens de mortalidade tanto nos grupos controles como nos grupos expostos aos preparasíticos deste mermitídeo (Tabela 10).

Tabela 10. Provas para avaliação de mermitídeos em hospedeiros alternativos.

Família	Espécie	% mortalidade								Doses
		Controle				Exposto				
Culicidae	<i>Aedes albopictus</i>	% - 10	25	5	25	25	25	15	45	7:1
		estádio - larval	I	II	III	IV	I	II	III	IV
	<i>Culex quinquefasciatus</i>		65				50			20:1
			30				20			35:1
			75				70			50:1
			50				50			90:1
Chironomidae	-		90				95			17:1
Ephydriidae	-		100				100			10:1
			100				100			50:1
Simuliidae	<i>Simulium subnigrum</i>		0				20			6:1

No ensaio feito com as larvas de *S. (I.) subnigrum* de terceiro estágio larval, observou-se que três dias após terem sido as larvas de simulídeos expostas aos preparasíticos de *Isomermis* sp. foram encontrados mermitídeos no interior de larvas quando realizou-se a dissecação das mesmas. A porcentagem de parasitismo obtida no grupo exposto foi de 20% e a média de infecção foi de 1 mermitídeo por larva de simulídeo infectada.

Apesar de muitos trabalhos terem focado o uso de mermitídeos para o controle de borrachudos (Bailey & Gordon, 1977; Molloy & Jamnback, 1977; Finney & Mokry, 1980) o grande problema continua sendo a criação em massa da espécie de borrachudo hospedeira em condições de laboratório (Petersen, 1985); pelo que no presente estudo nos

propusemos realizar algumas tentativas de infecção no laboratório de larvas de outros insetos com os preparasíticos de *Isomermis* sp.

A importância dos mermitídeos e sua incidência no controle biológico de simulídeos têm sido demonstrada experimentalmente nos trabalhos de Molloy & Jamnback (1977); os quais provocaram no laboratório infecção de *S. venustum* com *Mesomermis fluminalis*, chegando a 71,4% de parasitismo nas larvas. Quanto à introdução no campo, Likhovoz (1978 *apud* Molloy, 1987) inoculou nematódeos do gênero *Gastromermis* em correntes de água onde não ocorria parasitismo em simulídeos. Dois anos depois, devido à infecção das larvas, observou-se redução do número de simulídeos.

Estudos feitos por vários autores no laboratório indicam que *R. culicivorax*, apesar de não ocorrer naturalmente em simulídeos, teve sua infectividade demonstrada nestes hospedeiros. Finney & Mokry (1980) usaram *R. culicivorax* produzido comercialmente para parasitar larvas de *S. verecundum*. Esta espécie de mermitídeo não completou seu desenvolvimento no hospedeiro não usual, mas matou as larvas. Gaugler & Molloy (1981) conseguiram obter no laboratório uma mortalidade de 50% em *S. vittatum* utilizando nematódeos do gênero *Mesomermis*, a dose empregada foi de 34,5 mermitídeos/ml de água.

Apesar de não ter conseguido infectar larvas de *A. albopictus*, *C. quinquefasciatus*, Chironomidae e Ephydriidae no presente estudo, consideramos necessário dar continuidade as avaliações deste mermitídeo nestes e outros possíveis hospedeiros alternativos visando a manutenção da fase parasita deste nematódeo no laboratório e a obtenção completa de seu ciclo de vida, o que poderá permitir novas tentativas sobre a utilização deste mermitídeo nos programas de manejo integrado de simulídeos.

5. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem elaborar conclusões sobre o impacto de parasitas inimigos naturais em populações de simulídeos e das possibilidades de inclusão em programas de Manejo Integrado de pragas:

1-) Três tipos de patógenos parasitam naturalmente larvas de simulídeos nas localidades onde foram realizados os levantamentos: nematódeos da família Mermithidae, protozoários microsporídeos e se registra pela primeira vez o fungo *Coelomycidium* sp. em larvas de *S. pertinax* de Ilhabela/SP, uma localidade submetida durante vários anos ao controle químico.

2-) O microsporídeo encontrado nas localidades de Morungaba e Leme (Estado de São Paulo) corresponde à espécie *Polydispyrenia simulii* e o nematódeo mermitídeo encontrado na Serra do Japi/SP corresponde à espécie *Isomermis* sp.

3-) A prevalência de parasitismo de *Isomermis* sp. em larvas de simulídeos na Serra do Japi varia com a estação do ano, e é relacionada com a temperatura, precipitações e conseqüente aumento da vazão e da velocidade da água.

4-) A baixa taxa de prevalência da microsporidiose encontrada em larvas de simulídeos na Serra do Japi indica que o controle natural que exerce este parasita sobre as populações hospedeiras é de pequena expressão.

5-) A muda da etapa pós-parasita a adulta de *Isomermis* sp. ocorre dez dias depois de ter emergido o nematódeo da larva hospedeira de simulídeo à temperatura de 22 a 24 °C.

6-) Um meio de areia úmida colocada em um recipiente fechado e mantido à temperatura de 17°C é eficaz para a criação das formas de vida livre de mermitídeos no laboratório, e a sexta semana depois de se ter colocado as formas pós-parasitas recém emergidas das

larvas de simulídeos na cultura de areia úmida, parece ser a mais indicada para se realizar a inundação da cultura e se ter assim uma maior quantidade de larvas infectivas ou preparasíticas.

7-) Estádios iniciais das larvas de simulídeos são mais susceptíveis à penetração dos parasíticos de *Isomermis* sp.

8-) *Isomermis* sp. apesar de encontrar-se na natureza parasitando várias espécies de simulídeos, nas avaliações feitas no laboratório em outros grupos de insetos indicam até o momento que infecta só representantes da família Simuliidae.

9-) Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a importância do papel que exercem os inimigos naturais em populações de simulídeos, estimulando a realização de estudos mais detalhados sobre a biologia e ecologia destes parasitas para avaliar sua utilização como possíveis agentes de controle biológico em populações de simulídeos alvo de controle.

6. LITERATURA CITADA.

- Acero, A.V. Estudio preliminar de nemátodos en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) presentes en el Rio Chisaca y quebradas aledañas. Tesis de Grado (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, 1991. p.74.
- Adler, P.H. & Kim, K.C. The blackflies of Pennsylvania State University. *College of Agriculture Bulletin*. 856: 1-88, 1986.
- Alves, S.B. & Lecuona, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves, S.B. (Ed.), *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª edição. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 1998. p. 97-171.
- Ambrós, C. & Santamarina, A. Fecundidad y desarrollo embrionario de *Romanomermis culicivorax*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 46: 159-163, 1994.
- Ambrós, C. & Santamarina, A. Estudio de la oviposición del nemátodo parasito de larvas de culicidos *Romanomermis iyengari*, en el laboratorio. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 47: 167-170, 1995.
- Ambrós, G.C., Andrade, C.F.S. & Campos, J. Prevalência de parasitismos em populações de simulídeos no Estado de São Paulo, Brasil. Resumos do V Sicombiol, 1996. p. 140.
- Anderson, J.R. & Dicke, J. Ecology of the immature stages of some Wisconsin blackflies (Simuliidae:Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 53: 386-404, 1960.
- Andrade, C.F.S. & Castello Branco Jr., A. Susceptibilidade de populações de *Simulium pertinax* Kollar, 1932 (Culicomorpha, Simuliidae) ao temephos e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Rev. Saúde Pública*. 25: 367-370, 1991.
- Andrade, C.F.S. Manejo Integrado de Borrachudos. Anais XI Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas/SP. 3: 141-157, 1987.
- Andrade, C.F.S. Manejo Integrado de Borrachudos. Em: Seminários sobre Insetos e Acaros. Anais 3. Sociedade Entomológica do Brasil. Fundação Cargill. XI Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas, 1989. p. 141-157.
- Andrade, C.F.S., Castello Branco Jr. & Moreira, L.F.D.P. Resistência de populações de 3 espécies de Simuliidae ao insecticida temephos. Resumos XI do Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas/SP, Vol. 2, 1987. p. 406.

- Andreadis, T.G. Epizootiology of *Amblyospora connecticus* (Microsporida) in field populations of the Saltmarsh mosquito, *Aedes cantator*, and the cyclopoid copepod, *Acanthocyclops vernalis*. *J. Protozool.* **37**: 174-182, 1990.
- Bailey, C.H. & Gordon, R. Field and laboratory observations on a cytoplasmic polyhedrosis virus of blackflies (Diptera: Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.* **29**: 69-73, 1977.
- Bottger, K. Types of parasitism by larvae of water mites (Acari: Hydrachnellae). *Freshwater Biol.* **6**: 497-500, 1976.
- Brown, B.J. & Platzer, E.G. Salts and the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. *J. Nematol.* **10**: 53-64, 1978.
- Camino, N.B. Presencia de tres especies de mermítidos (Nematoda) parasitando a larvas de *Simulium lahillei* Peterson y Shannon, y descripción de *Mesomermis nortensis* sp. n. en la provincia de Tucuman. *Neotrópica.* **37**: 3-7, 1991.
- Camino, N.B. *Octomyomermis longispiculae* sp. n. (Nematoda: Mermithidae), parasita de *Simulium wolffhuegeli* (Enderlein) (Diptera: Simuliidae). *Neotrópica.* **38**: 105-109, 1992.
- Camino, N.B. Two new mermithids (Nematoda: Mermithidae) parasites of *Simulium wolffhuegeli*, Roubaud and *S. jujuyense* (Paterson and Shannon) (Diptera: Simuliidae) in Argentina. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* **88**: 571-575, 1993.
- Castello Branco Jr., A. Estudos Ecológicos e Patológicos da Infecção por *Polydispyrenia simulii* (Microspora: Pleistophoridae) em uma Comunidade de Simulídeos. Tese de Mestrado, Faculdade de Biologia, UNICAMP, Campinas/SP, 1991. p. 83.
- Castello Branco Jr., A. Patologia e epizootologia de *Simulium pertinax* (Diptera; Simuliidae) infectado por *Polidispyrenia simulii* (Microspora; Duboscqiidae) e *Gastromermis viridis* Nematoda; Mermithidae). Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas/SP, 1994. p.120.
- Castello Branco Jr., A. Protozoários entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. 2ª edição. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 1998. p. 571-605.
- Castello Branco Jr., A. & Andrade, C.F.S. Novo registro da ocorrência de microsporídeos em populações de simulídeos . Resumos do Segundo Seminário Nacional de Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos / III Reunião Brasileira sobre Simulídeos. Fundação Zoobotânica do Rio Grande de Sul. Porto Alegre/ R.S, 1988. p. 63-64.

- Castello Branco Jr., A. & Andrade, C.F.S. Estudos histopatológicos e bionômicos de *Polydispyrenia simulii* (Microspora, Pleistophoridae) em borrachudos (Diptera, Simuliidae). Resumo II Congresso Argentino de Entomología, I Seminario Latinoamericano de Vectores Urbanos y Animales Sinantrópicos y I Reunión Latinoamericana sobre simúlidos. La Cumbre, Córdoba, Argentina, 1991. p.17.
- Castello Branco Jr., A. & Andrade, C.F.S. Studies on *Polidispyrenia simulii* (Microspora; Pleistophoridae) in *Simulium pertinax* (Diptera; Simuliidae) in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88**: 167, 1993.
- Castello Branco Jr., A. & Habib, M.E.M. Estudos histopatológicos em diferentes estágios de desenvolvimento de *Simulium pertinax* (Diptera; Simuliidae) infectado por *Polydispyrenia simulii* (Microspora; Dubosquiidae). In: Resumos do XV Congresso Brasileiro de Entomologia. Caxambu, 1995. 809 p.
- Castello Branco Jr., A., Cecílio, A.T.B., Donato, J.L., Mendeleck, E., Moreira, L.F.D.P. & Cordeiro, N.S.. Ocorrência de Microsporídeos e Mermitídeos em Populações de Simuliidae. Resumos do V Encontro Internacional de Estudantes e Pesquisadores, UNICAMP, Campinas/SP, 1987. p. 24.
- Castello Branco Jr., A., Waib, C.M. & Andrade, C.F.S. Prevalência de *Polydispyrenia simulii* (Microspora, Pleistophoridae) em uma comunidade de borrachudos (Diptera, Simuliidae) com estudos de sintomatologia. Resumos do II Congresso Argentino de Entomologia. Córdoba, Argentina, 1991. p. 67.
- Castello Branco Jr., A., Waib, C.M. & Habib, M.E.M. Ocorrência natural de mermitídeos (Nematoda) em uma comunidade de borrachudos (Diptera, Simuliidae). Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba/SP, 1993. p.749.
- Colbo, M.H. & Porter, G.N. Distribution and specificity of Mermithidae (Nematoda) infecting Simuliidae (Diptera) in Newfoundland. *Can. J. Zool.* **58**: 1483-1490, 1980.
- Colbo, M.H. Size and fecundity of adult Simuliidae (Diptera) as a function of stream habitat, year and parasitism. *Can. J. Zool.* **60**:2507-2513, 1982.
- Cordeiro, N.S. & A., Castello Branco Jr. Developmental cycle and histopathological studies of *Thelohania* sp. (Microsporida: Thelohanidae) in larval blackflies (Diptera: Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83**: 232, 1988.
- Coscarón, S. El género *Simulium latreille* en la región neotropical: Análisis de los grupos supraespecíficos, especies que los integran y distribución geográfica (Simuliidae, Diptera). Belém, Museu Paraense Emilio Goeldi, 1987. 112 p.

- Coscarón, S. Estudios Ecológicos en Simúlidos Neotropicales (Diptera: Insecta). Em: Seminários sobre Insetos e Ácaros. Anais 3. Sociedade Entomológica do Brasil. Fundação Cargill. XI Congresso Brasileiro de Entomologia. Campinas, 1989. p. 69-98.
- Crosskey, R.W. The Natural History of Blackflies. Edit. John Wiley & Sons. New York, 1990. 710 p.
- Dejoux, C. Recherches préliminaires concernant l'action de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. WHO mimeo. Doc. WHO/VBC/79.721, 1979. 11p.
- Didier, E.S., Orenstein, J.M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L.B. & Janney, F.A. Comparison of Three Staining Methods for Detecting Microsporidia in Fluids. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3138-3145, 1995.
- Ezenwa, A. Mermithid and microsporidian parasitism of blackflies (Diptera: Simuliidae) in the vicinity of Churchill Falls, Labrador. *Can. J. Zool.* **50**: 1109-1111, 1973.
- Ezenwa, A.O. Ecologia of Simuliidae, Mermithidae, and microsporidia in Newfoundland freshwaters. *Canadian Journal of Zoology.* **52**: 557-565, 1974.
- Fairchild, G.B. & Barreda, E.A. DDT as a larvicide against Simulium. *J. Econ. Entomol.* **38**: 694-699, 1945.
- Federici, B.A. Site of action of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in mosquito and blackfly larvae. P. 37-47 In: Michal, F. (Ed.), *Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases*. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 1982. 188 p.
- Fetzner, M.L. & Strieder, M.N. Ocorrência de parasitos e patógenos em *Chirostilbia pertinax* (Diptera, Simuliidae), no Rio Grande do Sul - BR. Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Zoologia, Porto Alegre/RS, 1996. p. 26.
- Finney, J.R. & Mokry, J.E. *Romanomermis culicivorax* and simuliids. *J. Invertebr. Pathol.* **35**: 211-213, 1980.
- Fisher, F. & Sanborn, R. Production of insect juvenile hormone by the microsporidian parasite *Nosema*. *Nature.* **194**: 1193, 1962.
- Frost, S. Microsporidia (Protozoa: Microsporidia) in Newfoundland Blackfly Larvae (Dipt: Simuliidae). *Can. J. Zool.* **48**: 890-891, 1970.
- Garcia, R., Des Rochers, B., Tozer, W. Studies on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito larvae and other organisms. *Proc. Calif. Mosq. Vect. Cont. Assoc.* **49**: 25-29, 1981.

- Garcia, J.J., Hazard, E.I & Fukuda, T. Preliminary report of Microsporidia in Simuliidae larvae from Argentina. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **5**: 64-69, 1989.
- Garms, R. & Wash, J.F. The Migration and Dispersal of Black flies: *Simulium damnosum* s.l., The Main Vector of Human Onchocerciasis. In: Kim, K.C. & Merrit, R.W. (Ed.), *Blackflies: ecology, population management, and annotated world list*. Pennsylvania State University, University Park & London, 1987.p. 201-214.
- Garnham, P.C.C. & MacMahon, J.P. The eradication of *Simulium neavei*, Roubaud, from an onchocerciasis area in Kenya Colony. *Bull. Entomol. Res.* **37**: 619-627, 1947.
- Gassouma, M.S.S. Microsporidian parasites of *S. ornatum* in South England. *Parasitology.* **65**: 27-45, 1972.
- Gaugler, R. & Molloy, D. Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and its effect on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Environ. Entomol.* **9**: 704-708, 1980.
- Gaugler, R. & Molloy, D.P. Field evaluation of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*, as a biological control agent of blackfly (Diptera; Simuliidae). *Mosquito News.* **41** : 459-464, 1981.
- Gaugler, R. & Finney, J.R. A review of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype-14) as a biocontrol agent of black flies (Simuliidae). *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* **12**: 1-17, 1982.
- Gaugler, R., Kaplan, B., Alvarado, C., Montoya, J.& Ortega, M. Assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype 14 and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steiternematidae) for control of the *Simulium* vectors of onchocerciasis in Mexico. *Entomophaga.* **28**: 309-315, 1983.
- Gordon, R. Nematode Parasites of Blackflies. In: Nickle, W.R. (Ed.), *Plant and Insect Nematodes*, Marcel Dekker, Inc., 1984. p.821-847.
- Guimarães, E.L.G. Biologia e controle de simulídeos no Estado do Paraná. Resumos do I. Seminário sobre Vetores Urbanos e Animais Sinantrópicos, São Paulo, 1986. p.24.
- Hamada, N., Costa, W.L.S. & Darwich, S.M. Notes on artificial substrates for black fly (Diptera: Simuliidae) larvae and microsporidian infectin in central amazonia, Brazil. *An. Soc. Entomol. Brasil.* **26**: 589-593, 1997.
- Henrard, C. Quelques Protozoaires parasites des larves de *Simulium congolais*. *Revue de Zoologie et de Botanique Africaines.* **19**: 226-231, 1930.

- Henry, J. Natural and applied control of insects by Protozoa. *Ann. Rev. Entomol.* **26**: 49-73, 1981.
- Henry, J.E. & Oma, E.A. Pest Control by *Nosema locustae* a Pathogen of Grasshoppers and Crickets. In: H.D. Burges (Ed.), *Microbial Control of Pest and Plant - Diseases (1970-1980)*. Academic Press, London, 1981. p. 573-586.
- Hougard, J.M. The use of Bti in the onchocerciasis control programme in west Africa. Resumos do 6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBIOL), Rio de Janeiro/RJ, 1998. p. 501.
- Ignatius, R., Lehmann, M., Miksits, K., Regnath, M.A., Engelmann, E., Futh., U., Hahn, H. & Wagner, J. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 446-449, 1997.
- Jamnback, H. Recent developments in control of blackflies. *Annual Review of Entomology.* **18**: 281-304, 1973.
- Jamnback, H. The Origins of Blackfly Control Programmes: In: Laird, M. (Ed.), *Blackflies - The future for biological methods in integrated control*. Academic Press, London, 1981. p. 71-73.
- Jamnback, H. & Frempong-Boadu, J. Testing blackfly larvicides in the laboratory and in streams. *Bull. WHO.* **34**: 405-421, 1966.
- Kellen, W. R., Chapman, H.C., Clark, T.B., Lindegren. Host-parasite relationship of some *Thelohania* (Nosonematidae: Microspora) from mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* **7**: 161-166, 1965.
- Kramer, J.P. Longevity of microsporidian spores with special reference to *Octospora muscadomesticae*, *Flu. Acta Protozool.* **8**: 217-224, 1970.
- Lacey, L.A. & Mulla, M.S. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* as a biocide of blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 46-49, 1977.
- Lacey, L.A. & Mulla, M.S. Factors affecting the activity of diflubenzuron against *Simulium* larvae (Diptera: Simuliidae). *Mosq. News.* **38**: 264-268, 1978.
- Lacey, L.A. & Federici, B.A. Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.* **33**: 171-82, 1979.
- Lacey, L.A. & Undeen, A.H. Effect of formulation, concentration, and application time on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H-14) against black fly (Diptera: Simuliidae) larvae under natural conditions. *J. Econ. Entomol.* **77**: 412-418, 1984.

- Lacey, L.A. & Undeen, A.H. Microbial control of blackflies and mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.* **31**: 265-296, 1986.
- Lacey, L.A., Mulla, M.S. & Dulmage, H.T.. Some factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against blackflies. *Environ. Entomol.* **7**: 583-588, 1978.
- Larsson, R. Ultrastructure, function and classification of microsporidia. *Progress Protistol.* **1**: 325-390, 1986.
- Laws, E.R., Sedlak, V.A., Miles, J.W., Joseph, C.R., Lacomba, J.R. & Rivera, A.D. Field study of the safety of Abate for treating potable water and observations on the effectiveness of a control programme involving both Abate and Malathion. *Bull. WHO.* **38**: 439-445, 1968.
- Léger, L. Sur une nouvelle Myxosporidie de la famille des Glugeïdées. *Comptes Rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences.* **125**: 260-262, 1987.
- Levins, R. & M. Wilson. 1980. Ecological theory and pest management. *Annu. Rev. Entomol.* **25**: 287-308.
- Levine, N., Corliss, F., Cox, F., Deroux, J., Grain, J., Honingberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, E., Merinfeld, E., Page, F., Pljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protoozol.* **27**: 37-58, 1980.
-
- Liu, T. 1984. Ultrastructure of the midgut of the worker honey bee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *J. Invert. Pathol.* **44**: 282-291.
- Lutz, A & Splendore, A. Ueber Pebrine und verwandte mikrosporidien. Zweite Mitteilung. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und infektioskrankheiten.* **46**: 311-315, 1908.
- Lutz, A. & Splendore, A. Ueber Pebrine und verwandte Mikrosporidien. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten I.* **46**: 311-315, 1904.
- Maddox, J.V. The persistence of the microsporidia in the environment. *Ent. Soc. Am. Misc. Publ.* **9**: 99-104, 1973.
- Maddox, J.V. Protozoan diseases. In: Fuxa, J.R. & Tanada (Eds.), *Epizootiology of Insect Diseases*. John Wiley & Sons, New York, 1987. p. 417-452.
- Maia-Herzog, M, Shelley, A.J., Andrade de Luna Dias, A. P. & Malaguti. Comparação entre *Simulium brachycladum* e *S. rubrithorax*, suas posições no subgênero *Hemicnetha* e notas sobre uma espécie próxima, *S. scutistriatum* (Diptera: Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **79**: 341-356, 1984.

- Marino, G. S., Coscarón, S., Aurano, J., Loubes, C. & Meckert, P.C. Estudios sobre microsporídeos de la región neotropical. *Neotropica*. **25**: 127-132, 1979.
- Marino, G., Coscarón, S., Maurand, J., Loubes, C. & Cabeza Meckert, P.. Estudios sobre microsporídeos de la region neotropical. I. Sobre la presencia de *Pleistosphora simulii* (Lutz y Splendore) en la región austral de América (Microspora). *Neotrópica* **25**: 127-132, 1980.
- Maurand, J. & Loubés, C. Les microsporidies des larves de simulies: donnés ultrastructurales. *Z. Parasitenkd.* **56**: 131-146, 1978.
- McLaughlin, R.E. Use of Protozoans for Microbial Control of Insects. In: Burges, H.D. & N.W. Hussey (Eds.), *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, London, 1971. p.151-172.
- Molloy, D.P. Description and bionomics of *Mesomermis canadenensis* n.sp. (Mermithidae), a parasite of blackflies (Simuliidae). *J. Nematol.* **11**: 321-328, 1979.
- Molloy, D.P. The ecology of black fly parasites. In: Kim, K.Ch. & R. Merritt (Eds), *Blackflies, Ecology, Population Management, and Annotated World List*. The Pennsylvania State University Park and London, 1987. p. 315-323.
- Molloy, D. & Jamnback, H. Laboratory transmission of mermithids parasitic in blackflies. *Mosquito News*. **35**: 339-342, 1975.
- Molloy, D.P. & Jamnback, H. A. Larval blackfly control field trial using mermithids parasites and its cost implication. *Mosquito News*. **37**: 104-108, 1977.
- Molloy, D. & Jamnback, H. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a blackfly biocontrol agent and its effect on non-target stream insects. *J. Econ. Entomol.* **74**: 314-318, 1981.
- Molloy, D., Gaugler, R. & Jamnback, H.. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. *J. Econ. Entomol.* **74**: 61-64, 1981.
- Mondet, B. Études sur *Isomermis lairdi* (Nematoda: Mermithidae) parasite de *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) en Afrique de l'Quest. *Travaux et Documents de IÓRSTOM*. **141**: 1-161, 1981.
- Mondet, B.; Pendriez, B. & Bernadou, J. Étude du parasitisme des simulies (Diptera) par des Mermithidae (Nematoda) en Afrique de L'Quest.I. Observations préliminaires sur un cours déau temporaire de savane. *Cah. ORSTOM ser Ent. Méd. Parast.* **14**: 141-149, 1976.

- Moura, H., Nunes da Silva, J.L., Sodr , F.C., Brasil, P., Wallmo, K, Wallquist, S., Wallace, S., Croppo, G.P. & Visvesvara, G.S. Gram-Cromotrope a New Technique that Enhances Detection of Microsporidial Spores in Clinical Samples. *J. Euk. Microbiol.* **43**: 94-95, 1996.
- Mulla, M.S. & Lacey, L.A. 1976. Feeding rates of *Simulium* larvae on particulates in natural streams (Diptera: Simuliidae). *Environ. Ent.* **5**: 283-287, 1976.
- Mulvey, R.H. & Nickle, W.R. 1978. Taxonomy of mermithids (Nematoda: Mermithidae) of Canada in particular of the Mackenzie and Porcupine river systems, and Somerset Island, N. W. T., with descriptions of eight new species and emphasis on the use of male characters in identification. *Can. J. Zool.* **56**: 1291-1329.
- Nickle, N.R. A contribution to our knowledge of the Mermithidae (Nematoda). *J. Nematol.* **4**: 143-146, 1972.
- Nolan, R. Mass production of pathogens. In: Laird, M. (Ed.), *Blackflies- The future for biological methods in integrated control*. Academic Press, London. 1981. p. 319-324.
- Olson, J.K. Application of the concept of Integrated Pest Management (IPM) to mosquito control programs. *Mosquito News.* **39**: 737-752, 1979.
- OMS. Epidemiologia de la Oncocercosis. *Serie de informes técnicos da Organiza o Mundial da Saude*, N  597, Ginebra, 1976, 103 p.
- Paine, E.O. & Mullens, B.A. Distribution, seasonal occurrence, and patterns of parasitism of *Heleidormis magnapula* (Nematoda: Mermithidae), a parasite of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in California. *Environmental Entomology.* **23**: 154-169, 1994.
- Pegoraro, R.A. Ciclo biológico de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae). *Ann. Soc. Ent. Brasil.* **22**: 29-38, 1993.
- Petersen, J.J. Factors affecting sex ratios of a mermithid parasite of mosquitoes. *J. Nematol.* **4**: 83-87, 1972.
- Petersen, J.J. Nematodes as biological control agents part I. Mermithidae. *Adv. Parasitol.* **24**: 307-344, 1985.
- Petersen, J.J. & Willis, O.R. Results of preliminary field application of *Reesimermis nielsenii* (Mermithidae:Nematoda) to control mosquito larvae. *Mosquito News.* **32**: 312-316, 1972.
- Peterson, B.V. Notes on some natural enemies blackflies (Diptera: Simuliidae). *Can. Entomol.* **92**: 266-274, 1960.

- Pettit, J.H.S. Dermatological Problems. In: Manson-Bahr, P.E.C. & D.R. Bell (Eds.), *Manson's Tropical Diseases*. Baillière Tindall, 1987. p.1054-1070.
- Pinheiro, F.P., Bensabath, G., Costa, D., Maroja, O.M., Lins, Z.C. & Andrade, A.H.P. Hemorrhagic syndrome of Altamira. *The Lancet*. **13**: 639-642, 1974.
- Platzer, E.G. and Brown, B.J. Physiological ecology of *Reesimermis nielsenii*. *Procc. Int. Colloq. Invert. Path. Kingston, Canada*, 1976. p.263-267.
- Platzer, E.G. Biological control of mosquitoes with the mermithid nematode *Romanomermis culicivorax*. *Univ. Calif. Mosq. Control Res. Annual Report*. **78**: 47-51, 1978.
- Poinar Jr., G.O. Entomogenous Nematodes. A manual and host list of insect-nematode associations, Leiden, E.J. Brill, 1975, 317 p.
- Poinar Jr, G.O. Mermithid Nematodes of Blackflies. In: M. Laird (Ed.), *Blackflies - The future for Biological Methods in Integrated Control*. Academic Press, London, 1981. p. 159-170.
- Poinar Jr, G.O.. The Natural History of Nematodes. Prentice-Hall, inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1983. 390 p.
- Prasad, V. & Cook, D.R. The taxonomic of water mite larvae. *Mem. Am. Entomol. Inst.* **18**: 1-326, 1972.
- Procnier, W. S. Cytological approaches to simuliid biosystematics in relation to the epidemiology and control of human onchocerciasis. *Genome*. **32**: 559-569, 1989.
- Ramírez-Pérez, J. Vectores de la Oncocercosis humana en la región neotropical. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **98**: 117-132, 1985.
- Rey, L. Parasitologia. 2ª edição, Guanabara, Rio de Janeiro, 1991. 371 p.
- Ruas Neto, A.L. Avaliação do uso de Temefós para o controle de simulídeos no Rio Grande do Sul. *B. Saúde*, Porto Alegre. **11**: 27-31, 1984.
- Ruas Neto, A.L. & Matias, R.S. Controle integrado do *Simulium (Chirostilbia) pertinax* Kollar, 1832 - A competição interespecífica como possível método de controle natural. *B. Saúde*, Porto Alegre. **12**: 21-24, 1985.
- Rubtsov, I.A. On the gynandromorphs and intersexes in blackflies (Simuliidae:Diptera). *Zool. Zh.* **37**: 458, 1958.

- Rubtsov, I.A. Mermithidae: Taxonomic criteria for their juvenile stages and blackflies biocontrol prospects. In: M. Laird. (Ed.), *Blackflies: The future for biological methods in integrated control*. Academic Press, London, 1981. p.171-180.
- Rubtsov, I.A. On mermithids parasitic in blackflies. *Zool.Zh.* **42**: 1768-1784, 1963.
- Ryan, J.K. & Hilchie, G.J. Black fly problem in Athabasca County and vicinity, Alberta, Canada. *Mosquito News.* **42**: 614-616, 1982.
- Santamarina, M. A. Valoración de la capacidad biorreguladora del nematodo parásito *Romanomermis culicivorax* en poblaciones larvales de mosquitos de importancia medico-epidemiológica y su producción masiva en Cuba. Tesis Doctoral, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Cuba, 1991. p.147.
- Shamseldean, M.M. & Platzer, E.G. *Romanomermis culicivorax*: penetration of larval mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* **54**: 191-199, 1989.
- Shelley, A. J., Luna Dias, A. P.A. & Maia-Herzog, M. New specific synonymy in neotropical *Simulium* s.l. (Diptera: Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **79**: 143-161, 1984.
- Shelley, A.J., Luna Dias, A.P.A., Moraes, M.A.P. & W.S., Proconier. The status of *Simulium oyapockense* and *S. limbatum* as vectors of human onchocerciasis in Brazilian Amazonia. *Med. Vet. Entomol.* **1**: 219-234, 1987.
- Sprague, V. & Vernick, S. Light and electron microscope study of a new species of *Glugea* (Microsporidia, Nosonematidae) in the 4-Spined Stickleback *Apeltes quadracus*. *J. Protozool.* **15**: 547-571, 1968.
- Stirling, A.M. & Platzer, E.G. *Catenaria anguillulae* in the mermithid nematode *Romanomermis culicivorax*. *J. Invertebr. Pathol.* **32**: 348-354, 1978.
- Strickland, E.H. Some parasites of *Simulium* larvae and their effects on the development of the host. *Biol. Bull.* **21**: 302-338, 1911.
- Sweeney, A.W. & Becnel, J.J.. Potencial of Microsporidia for the Biological Control of mosquitoes. *Parasitology Today.* **7**: 217-220, 1991.
- Takaoka, H. Pathogens of blackfly larvae in Guatemala and their influence on natural populations of three species of onchocerciasis vectors. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 467-472, 1980.
- Tanada, Y. Epizootology and Microbial Control. In: Bulla Jr., L.A. & T.C. Cheng, (Eds.), *Comparative Pathobiology, Biology of the Microsporidia*. Plenum Press, 1976. p. 247-279.

- Thompson, B.H. & Adams, B.G. Laboratory and field trials using Altosid® insect growth regulator against blackflies (Diptera: Simuliidae) of Newfoundland Canada. *J. Med. Entomol.* **16**: 536-546, 1979.
- Torres, O. Estudios preliminares de microsporídeos y otros patógenos en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) de La Calera. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, 1988. p. 109.
- Torres, F.O., Muñoz de Hoyos, P., Romero de Pérez, G. Parasitismo en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) del río Teusaca: microsporídeos, mermitídeos y hongos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* **XVIII**: 253-264, 1991.
- Trapido, H., D'Alessandro, A. & Little, M.D. Onchocerciasis in Colombia. Historical background and ecologic observations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **20**: 104-108, 1971.
- Travis, B. & Schuchman, S.. Test (1967) with black fly larvicides. *J. Econ. Entomol.* **61**: 843-845, 1968.
- Undeen, A.H. Microsporida infections in adult *Simulium vittatum*. *J. Invertebr. Pathol.* **38**: 426-427, 1981.
- Undeen, A.H. & Nagel, W.L. The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Golberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. *Mosquito News.* **38**: 524-527, 1978.
- Undeen, A.H. & D., Berl. Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac against *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) larvae. *Mosquito News.* **39**: 742-745, 1979.
- Undeen, A.H. & Colbo, M.H. The efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against blackfly larvae (Diptera: Simuliidae) in their natural habitat. *Mosquito News.* **40**: 181-184, 1980.
- Undeen, A.H., Takaoka, H. & Hansen, K. A test of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac as a larvicide for *Simulium ochraceum*, the Central American vector of onchocerciasis. *Mosquito News.* **41**: 37-40, 1981.
- Vulcano, M.A. Descrição do alótipo de *Simulium pruinosum* Lutz, 1910 e caracteres adicionais da fêmea. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **57**:33-44, 1959.
- Wallace, F.G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Experimental Parasitology.* **18**: 124-193, 1966.
- Walsh, J.F., Davies, J.B. & Cliff, B.. World Health Organization Onchocerciasis Control Programme in the Volta River basin. In: Laird, M. (Ed.), *Blackflies: the future for*

- WHO. *Simulium, Training and information guide*. Division of Control of Tropical Diseases. World Health Organization. Vector Control Series. WHO/VBC/91.992. Geneva, 1991, 115 p.
- White, S.E., Fukuda, T. & Undeen, A.H. Horizontal transmission of *Amblyospora opacita* (Microspora: Amblyosporidae) between the mosquito, *Culex territans*, and the copepod, *Paracyclops chiltoni*. *J. Invertebr Pathol.* **63**: 19-25, 1994.
- Womeldorf, D.J. Funding for Integrated Pest Management in Mosquito Control. *Mosquito News.* **39**: 729-731, 1979.

7. ANEXOS

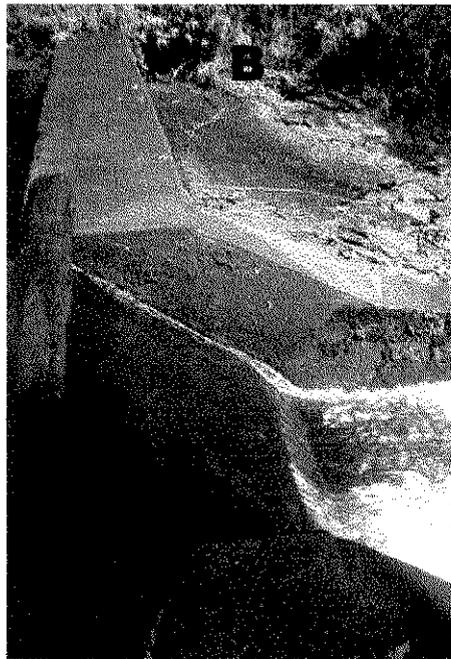


Figura 10. Microambientes pesquisados na Serra do Japi/SP.
A, Leito do riacho; B, Rampa de cimento à jusante do lago.

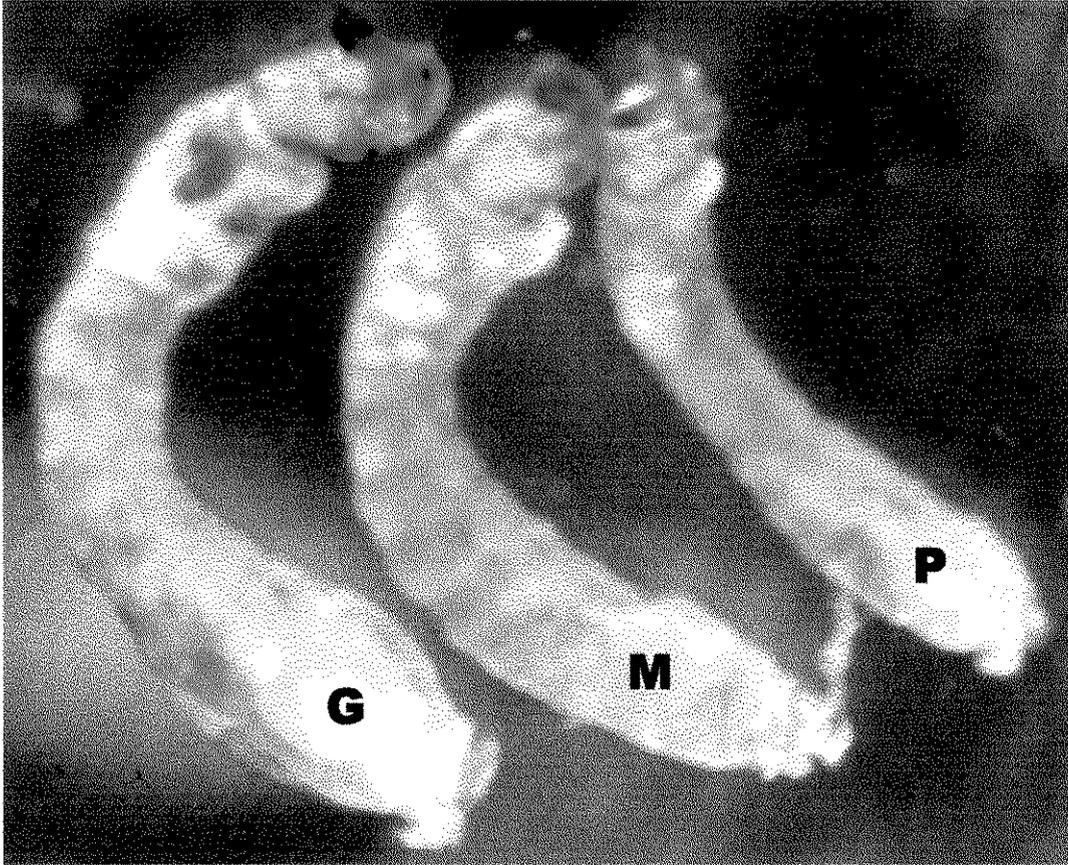


Figura 11. Larvas de simulídeos.
Pequena (P); Média (M); Grande (G). 5 x.

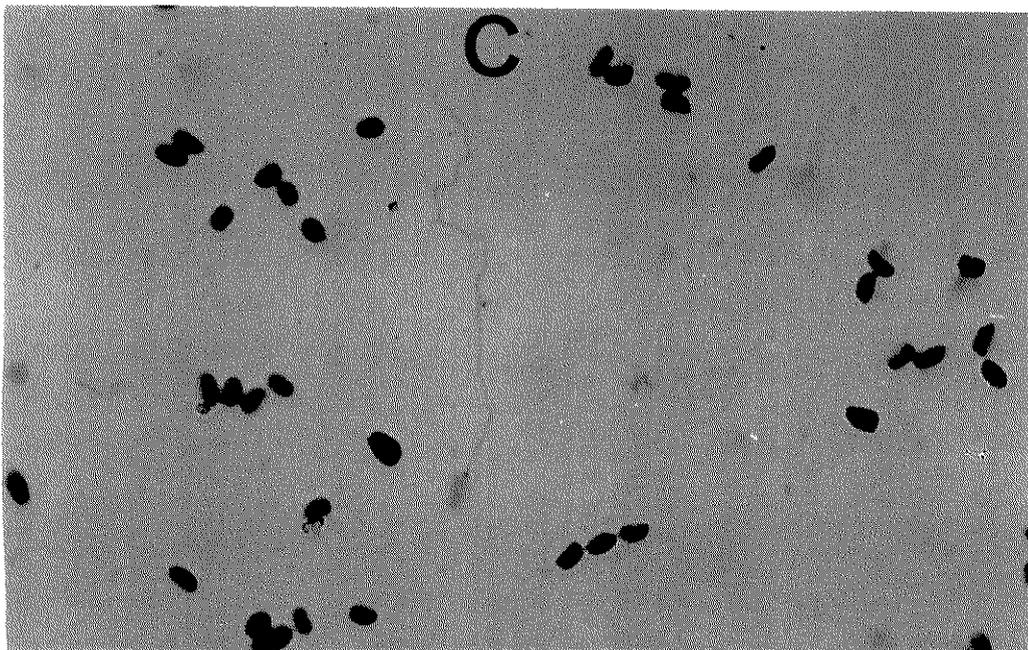
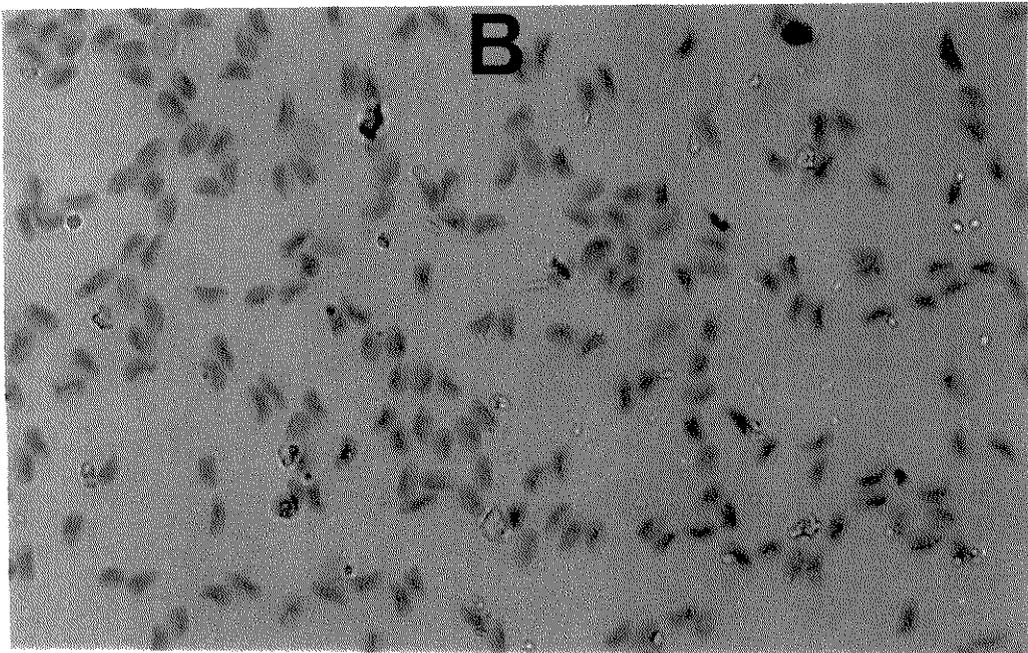
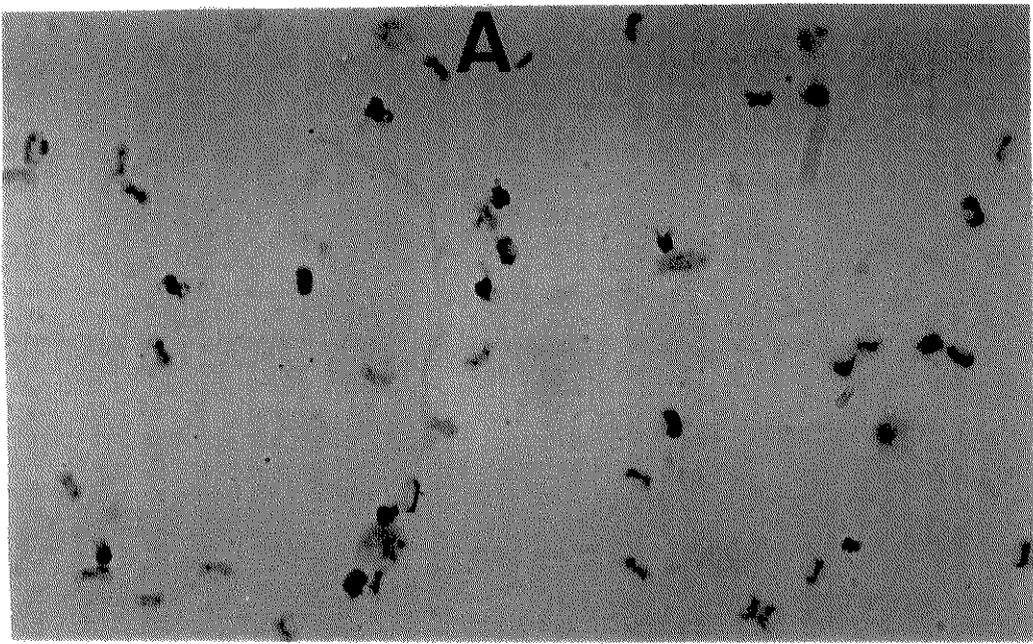


Figura 12. Esporos de *Polydispyrenia similii*.
A, Coloração pelo Ácido Tricomio modificada;
B, Coloração pelo Gram-Cromotrope;
C, Coloração pelo Giemsa. 330 x.

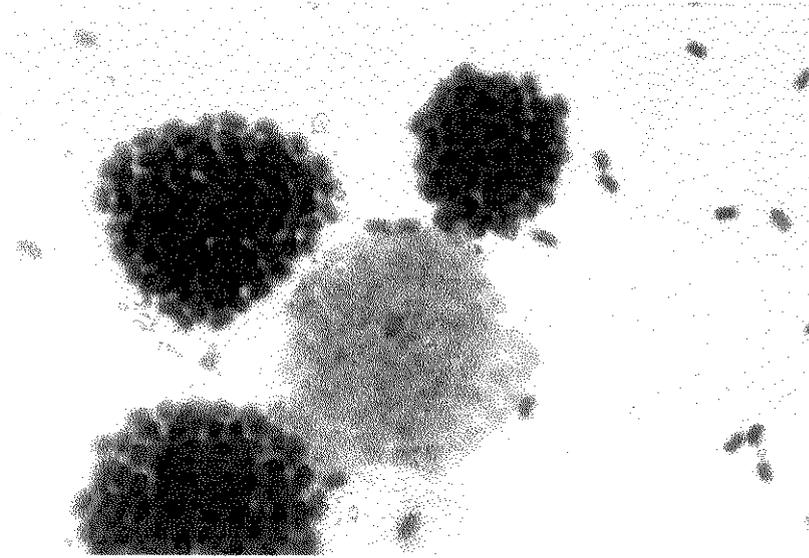


Figura 13. Esporoblastos e esporos maduros, dentro de vesículas do esporóforo, de *Polydispyrenia simulii*. Coloração pelo AFT. 330x.

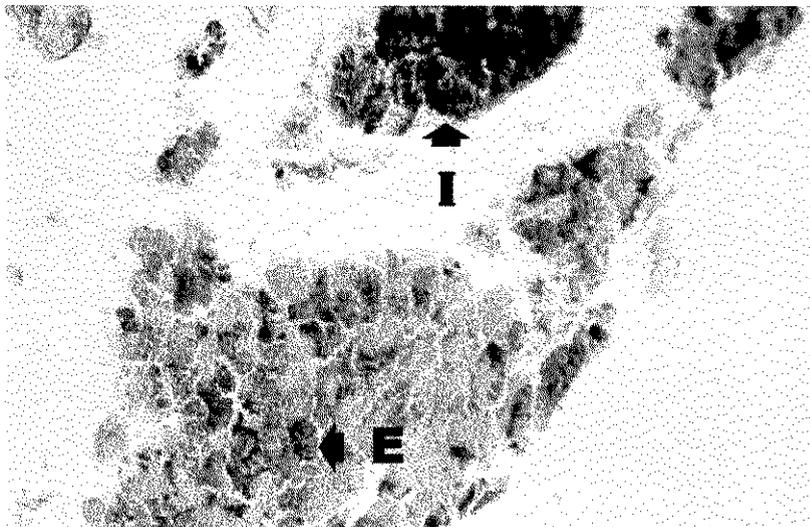


Figura 14. Corte transversal de larva de simúlideo infectada com *Polydispyrenia simulii*. Intestino (I), Esporos (E). 330x.

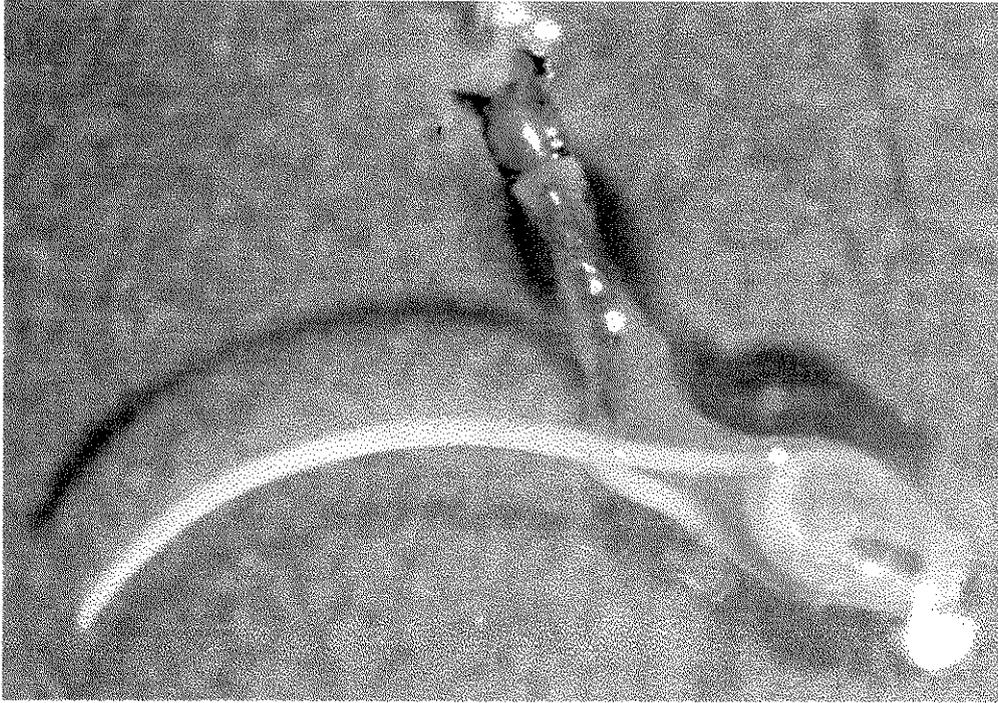


Figura 15. Pós-parasita de *Isomermis sp* emergindo da larva de simulídeo. 5 x.

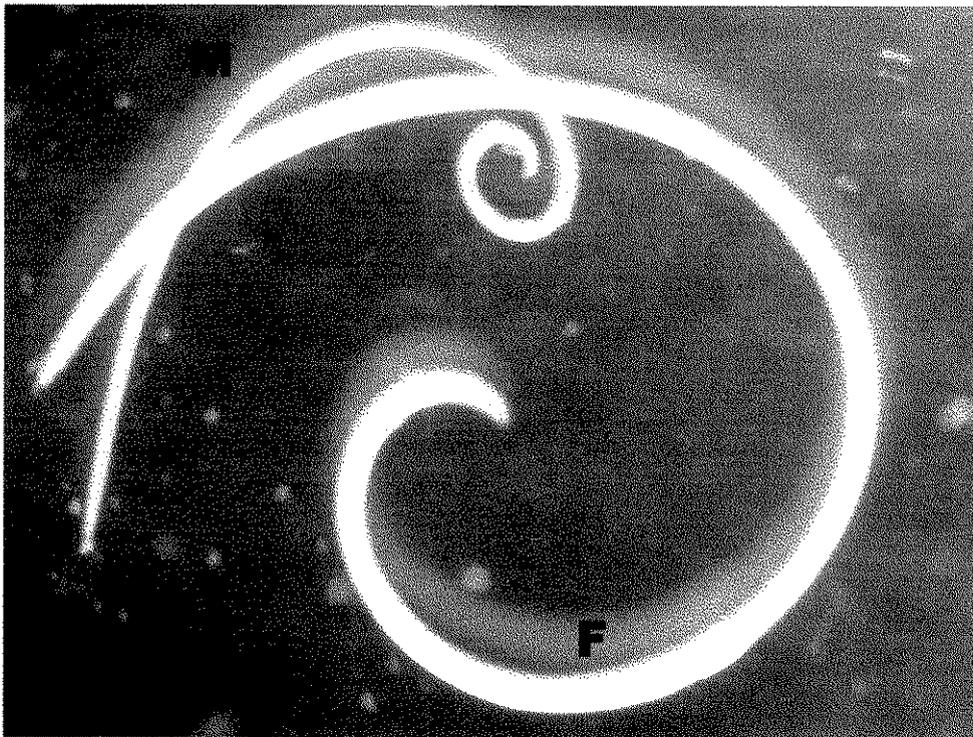


Figura 16. Adultos de *Isomermis sp.*
Fêmea (F); Macho (M). 5 x.

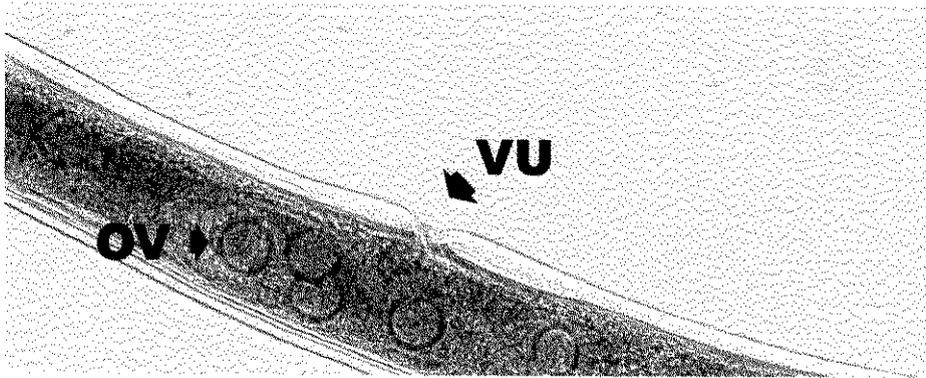


Figura 17. Fêmea grávida de *Isomermis sp.*
Vulva (VU); Ovos (OV). 66 x.

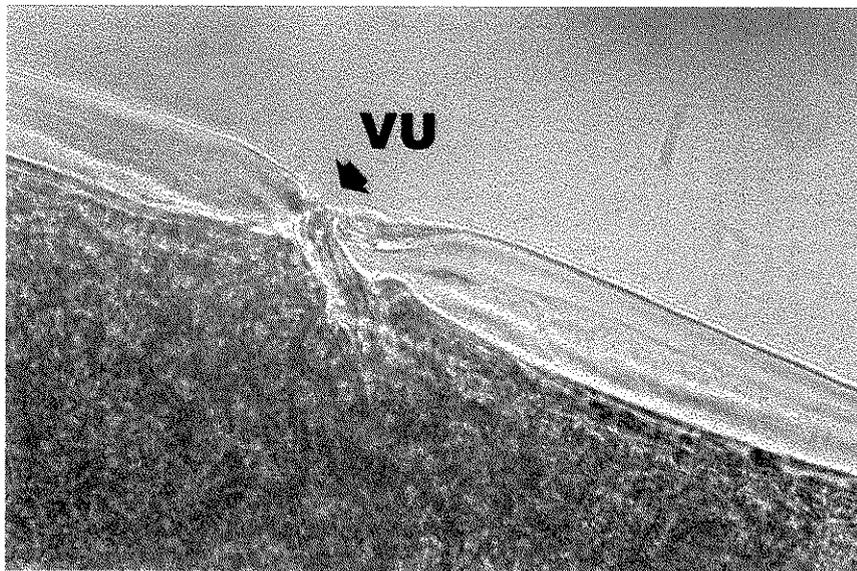


Figura 18. Fêmea de *Isomermis sp.*
Vulva (VU). 198 x.

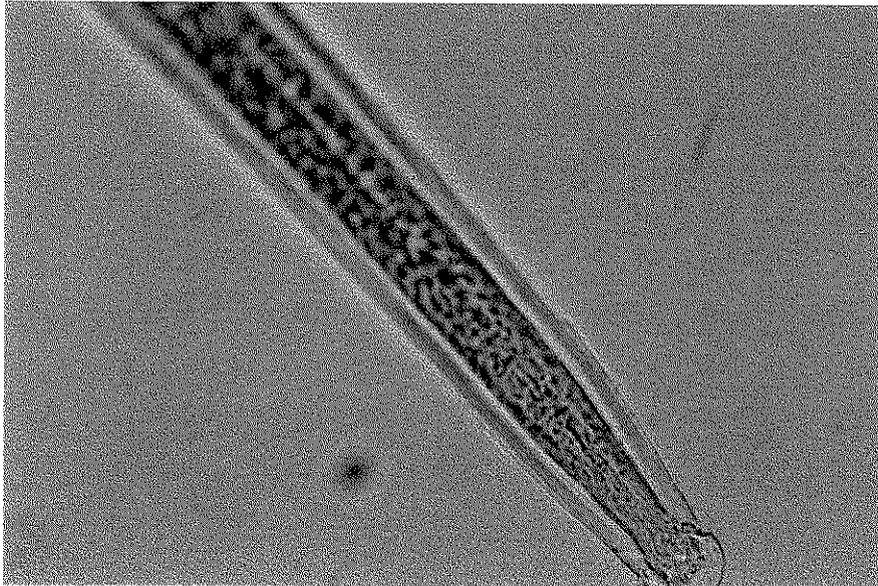


Figura 19. Extremidade anterior do macho de *Isomermis sp.* 66 x.

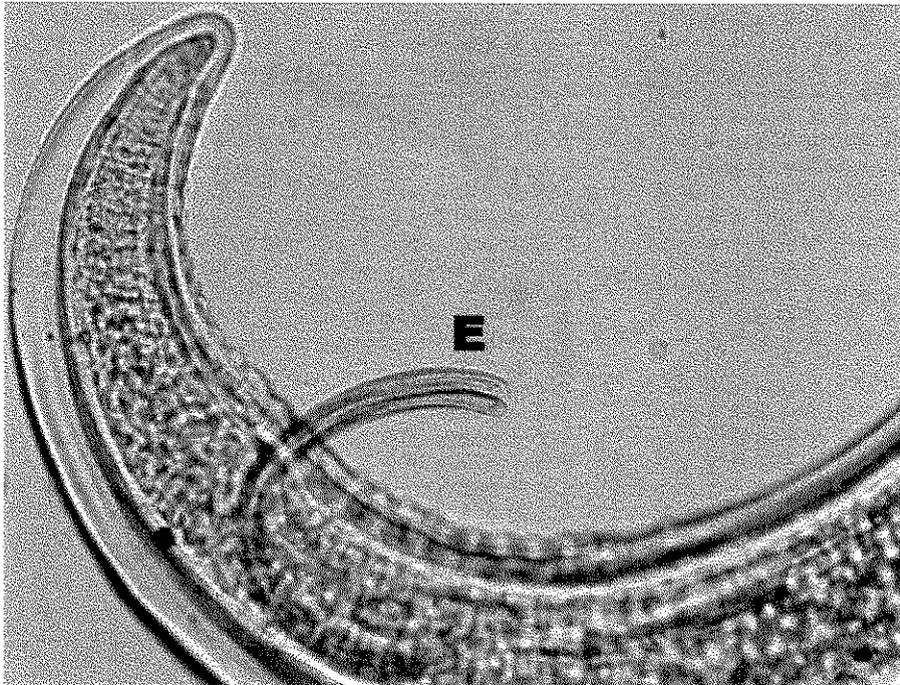


Figura 20. Extremidade posterior do macho de *Isomermis sp.*
Espícula (E). 132 x.



Figura 21. Corte transversal de larva de simúlideo parasitada por *Isomermis sp.* Mermítideo (ME). 330 x.

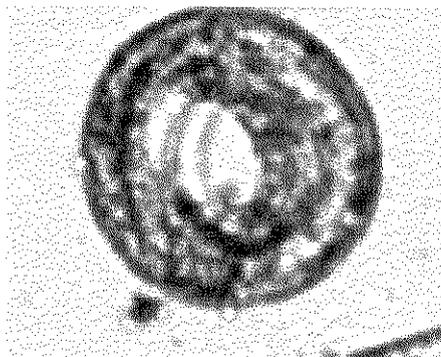


Figura 22. Ovo de *Isomermis sp.* 198 x.