



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

ELIS PAULA DE ALMEIDA BATISTA

**ARMADILHA BG-MALÁRIA PARA MONITORAMENTO DE ANOFELINOS
NEOTROPICAIS E AFRO-TROPICAIS: OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
APLICABILIDADE COMO FERRAMENTA COMPLEMENTAR DE CONTROLE
DA MALÁRIA**

Belo Horizonte, MG

Agosto/2019

Elis Paula de Almeida Batista

**ARMADILHA BG-MALÁRIA PARA MONITORAMENTO DE ANOFELINOS
NEOTROPICAIS E AFRO-TROPICAIS: OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
APLICABILIDADE COMO FERRAMENTA COMPLEMENTAR DE CONTROLE
DA MALÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Eduardo Eiras

Coorientadora: Dra. Kelly da Silva Paixão

Coorientador no exterior: Dr. Fredros Oketch Okumu

Belo Horizonte, MG

Agosto/2019

043

Batista, Elis Paula de Almeida.

Armadilha BG - Malária para monitoramento de anofelinos neotropicais e afro-tropicais: otimização e avaliação da aplicabilidade como ferramenta complementar de controle da malária [manuscrito] / Elis Paula de Almeida. - 2019.

166f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Eduardo Eiras. Co-Orientadora: Profa. Dra. Kelly da Silva Paixão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia - Teses. 2. Malaria-controle. 3. Monitoramento. 4. Anopheles. 5. Armadilhas para insetos. I. Eiras, Álvaro Eduardo. II. Paixão, Kelly da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO
Elis Paula de Almeida Batista

297/2019/11
entrada
2º/2015
2015713411

Às nove horas do dia 30 de agosto do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Armadilha BG Malária para monitoramento de anofelinos neotropicais e afro-tropicais: Otimização e avaliação da aplicabilidade como ferramenta de controle da malária”**, área de concentração: **Entomologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Álvaro Eduardo Eiras**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Álvaro Eduardo Eiras	UFMG	APROVADA
Dr. Karlos Diogo de Melo Chalegre	SCTIE	APROVADA
Dr. Marcelo Carvalho de Resende	FUNASA	APROVADA
Dra. Tatiana Mingote Ferreira de Ázara	Ministério da Saúde	APROVADA
Dra. Érika Martins Braga	UFMG	APROVADA
Dra. Kelly da Silva Paixão	UFMG	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	—
Recomendações	PASSADAS A ALUNA
Sugestões	—

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2019.

Dr. Álvaro Eduardo Eiras
(Orientador)

Dr. Karlos Diogo de Melo Chalegre

Dr. Marcelo Carvalho de Resende

Dra. Tatiana Mingote Ferreira de Ázara

Dra. Érika Martins Braga

Dra. Kelly da Silva Paixão
(Coorientadora)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

[Assinatura]
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Portaria no. 3.594 - 03/08/2019
SI/PS: 1517341

Instituições envolvidas



IFAKARA HEALTH INSTITUTE
research | training | services



Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo no Controle de Vetores, Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, sob a orientação do Professor Dr. Álvaro Eduardo Eiras, co-orientação da Dra. Kelly da Silva Paixão e orientação externa do Dr. Fredros Oketch Okumu pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior realizado no Ifakara Health Institute, Ifakara, Tanzania – IHI. A tese também foi realizada no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Colaboradores

Msc. Halfan Ngowo – IHI

Msc. Mercy Opiyo – IHI

Gasper Shubis – IHI

Felician Meza – IHI

Doreen J. Siria – IHI

Dr. Wanderli Pedro Tadei – INPA

Dra. Rosemeire Aparecida Roque – INPA

DEDICATÓRIA

*A todos os pós-graduandos, que mesmo em meio a tantos problemas, como a baixa remuneração, ainda mantêm a ciência viva no país. A todos vocês que travam árduas batalhas para fazer pesquisa em um país que pouco reconhece e investe na ciência e que, assim como eu, fazem parte dos 40% de alunos que sofrem de depressão e ansiedade, muitas vezes vivendo situações-limite, eu dedico essa tese com muito carinho. Eu só tenho a dizer, as coisas vão melhorar e vocês irão conseguir, eu consegui. **Just Keep swimming!***

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Parasitologia** da UFMG pela minha formação e por se manter como um programa de excelência há 50 anos.

Às queridas **Sibele** e **Sumara**, que sempre tão atenciosas e prestativas ajudam todos os alunos e resolvem todos os pepinos.

Aos **funcionários, Professores do Departamento de Parasitologia** e (obviamente!) ao **Sr. Neri** por todos os ensinamentos e comida (no caso do “Seu” Neri).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) por viabilizarem a realização desse projeto no Brasil e na Tanzânia.

Ao meu orientador, **Álvaro Eiras**, pela grande oportunidade da minha vida. Nem nos meus melhores sonhos eu imaginei que aceitar o convite para trabalhar no Lintec no final de 2014 e me mudar “de mala e cuia” para BH um mês depois (uma loucura, eles disseram), proporcionaria as melhores oportunidades, os melhores momentos e o período de maior crescimento (pessoal e profissional) da minha vida. Obrigada pela paciência, incentivo, me apresentar o tal do torresmo de barriga (saudações, Meire!) e, também, por me apresentar pessoas maravilhosas.

À Dra. **Kelly Paixão**, primeiramente, por ter intermediado minha vinda pra cá e, também, por ser essa pessoa linda e profissional excelente, um exemplo para mim. Por todos os ensinamentos, paciência, incentivo e ajuda para realizar essa tese. Sempre aprendo muito com você e tenho muito orgulho de ser sua amiga.

Ao meu outro orientador, Dr. **Fredros Okumu**, por ter proporcionado a minha primeira ida à Tanzânia e ter me colocado na direção certa para realizar esse trabalho quando eu me sentia perdida. Por todos os grandes ensinamentos (*There is always space for improvement*), oportunidade e por ter ampliado a minha visão de como fazer ciência, meu muitíssimo obrigada.

Aos pesquisadores do INPA, Dra. **Rosemeire Roque** e Dr. **Wanderli Tadei**, pelo apoio logístico durante os experimentos em Manaus, as conversas e sugestões para conduzir o trabalho. **Rose**, um agradecimento especial pela hospedagem, passeios e risadas.

À todos os amigos do Lintec, **Agustin, Amanda, Ana, André, Daniel, Hil, Ju, Léo, Marcelo, Tales, Hans, Rafael, Sara (Ellen e Vegana), Vítor, Natália, Bruna, Carol (as duas)** e **Jennifer**, vocês fazem o dia no laboratório ser mais divertido. Um agradecimento

especial para o **Richard** e a **Bruna** (ruiva), os primeiros amigos em BH, obrigada por todos os momentos felizes, o incentivo de sempre e as comidas, principalmente a canjiquinha da mãe da Bruna (supera, Richard!). Agradeço muito também à **Luana**, rainha do Lintec, que está sempre quebrando o galho da galera e brigando quando deixam louça suja na pia ou mexem na sua comida.

Aos amigos que fiz na Tanzânia, que ajudaram a amenizar a saudade de casa e me apresentaram esse país incrível. Em especial à **Doreen, Mercy, Arnold, Kyeba, Alex, Halfan, Gasper, Felician, Gustave, Manu, Sallum, Rukyia, Monica, Mwajabu, Haika, Nancy** e **Lina**, asante sana! Agradeço também aos integrantes do grupo TCI (*Temporary Citizens of Ifakara*) ou Mzungo's club, **Beatrix, Kelly, Elina, Chelsey, Amélie, Colin, Vanesa, Silvan, Christine, Susana** e **Rahel**, pelos passeios, viagens e jantares, thank you!!!

Ao pessoal do Laboratório de Malária e Dengue do INPA, **Claudia, Hergen, Rejane, Augusto, Max** e o **Seu Nonato**, muito obrigada por toda ajuda em Manaus, tanto no trabalho quanto na parte social.

Aos amigos do Laboratório de Imunohelmintologia, minha segunda casa no ICB, **Professora Deborah, Laura, Mari, Xuão, Xéferson, Xenil (marido), Guilherme, Gustavo, Michele, Vanessa** e **Cris**, pelas festas, comidinhas, risadas, companheirismo e pela oportunidade de exercer uma função que eu amo, ser porta-estandarte do Pellegrino. Amo vocês!

À melhor turma de doutorado que eu poderia ter. **Fernanda**, nossa turma arrasa!!!

Ao meu lar, República Woodystock, e minhas roommates **Samira** e **Thaís**, pelos momentos em família, viagens e muito amor envolvido.

Samirooo...ca, apesar de achar que você deveria estar no parágrafo onde agradeço a Deus por todas as coisas boas da vida, você merece um parágrafo só para você. Irmã, muito obrigada por simplesmente existir, você esteve ao meu lado e segurou minha mão em alguns dos piores momentos da minha vida e em vários momentos felizes também. São tantas coisas para agradecer que se eu continuar, ao invés de um parágrafo vai virar uma página, mas você sabe a importância que tens na minha vida. Obrigada!

À **Elizângela**, outro anjo na minha vida, since 2004. São tantos anos, tantas histórias, tantas aventuras, inclusive na África, como se não bastasse ser os anos de amizade em Porto Velho, desde 2016, temos muitas histórias aqui em BH também e que sigamos juntas por muito mais tempo. Obrigada pelo seu apoio e amor incondicionais.

Aos amigos **Vanessa** e **Vini**, obrigada pelo apoio, torcida e por serem meu porto seguro.

Agradeço muito também aos demais amigos que esse lindo Belo Horizonte me deu, **Bruna Leal**, **Isadora** (filha), **Rafaela**, **Saulo** (obrigada pela figura linda do capítulo II e pelas discussões filosóficas), **Honey**, **Dayane** e **Ubalda**, **Nora**, **Roney**, **Ramon**, **Fernando**, **Fernanda**, **Bárbara**, **Dani Bolina**. As amigas **Maíra** e **Andressa** por todo o carinho, apoio e ombro, meu muito obrigada! **Andressa**, agradeço também a sua família pelo carinho e hospitalidade, ainda vou tomar uma cerveja com **Dona Janice**.

Aos amigos da vida inteira **Soraya** e meus sobrinhos **Pedro** e **Maitê**, **Wanne**, **Eline** e meu sobrinho **João**, **Carol**, **Fabi**, **Sula**, **Kayena**. Aos amigos da H-2, **Susana**, **Fernanda**, **Tia Núbia** e **Gentileza**.

À **Carina** e ao **Diego**, pelo amor, apoio e dedicação, mas principalmente pela bolotinha de amor que vocês fizeram, **Marina**.

À **Elizete** e à **Kátia**, por terem me resgatado do abismo e me ajudarem a manter a sanidade.

À minha família, os **Almeidas** e os **Batistas**, em especial o **Tio Ventura**, **Tia Angelina**, **Pepe**, **Quetlele**, **Livia**, **Pedro Henrique**, **Lutio**, **Carol** e todos os demais familiares, que são muitos! Incluo também a **família Brito**, muito obrigada pelo acolhimento e animação de sempre!

À minha **Mamy Poderosa** por ser a mulher mais forte que conheço e por todo amor, dedicação e apoio incondicional. Ao meu **Papi Soberano** por todo o amor e dedicação e, também, por ter me ensinado o prazer da leitura e da escrita. Aos meus irmãos, **Alan** e **Ana Clara**, eu amo vocês. **Alan**, mesmo com tantas brigas, nada mais normal entre irmãos, você sempre cuidou de mim e apoiou todas as minhas decisões, por mais loucas que parecessem, obrigada maninho!!!

Ao meu filho/irmão **Frederico Wiliam de Almeida Batista** pelo amor incondicional, risadas (latidos) e consolo nos momentos difíceis. Você foi o melhor presente da minha vida!!!

Existe uma série de outras pessoas a quem gostaria de agradecer por esse trabalho ter se tornado real. Alguns me ensinaram ciências, outros me ensinaram coisas cotidianas e alguns me ensinaram sobre a vida. Mesmo que seus nomes não estejam aqui, em meu coração e em minha mente serei eternamente grata.

À **Deus** por sempre cuidar de mim e da minha família, permitir a realização desse trabalho e atender minhas orações.

*Todas nós seguimos em frente quando percebemos como são fortes e admiráveis as mulheres à
nossa volta.*

(Outros jeitos de usar a boca - Rupi Kaur)

RESUMO

A armadilha BG-Malária (BGM) foi desenvolvida a partir de modificações realizadas na armadilha BG-Sentinel (BGS), sendo demonstrada como uma ferramenta eficaz para capturar o principal vetor brasileiro da malária, o *Nyssorhincus darlingi*, porém ainda não foi testada para capturar anofelinos africanos. Nesse sentido, a BGM foi avaliada para capturar anofelinos africanos em experimentos conduzidos na Tanzânia, onde foi comparada à BGS e à atração humana (HLC) em campo. Em semicampo a comparação foi realizada somente com a BGS, utilizando fêmeas de *Anopheles arabiensis* da colônia do Ifakara Health Institute. A dinâmica de voo de *An. arabiensis* próximos às armadilhas BGM e BGS também foi avaliada em estúdio de filmagem. Em campo, a HLC mostrou-se mais eficaz para capturar *Anopheles gambiae s.l.* que ambas as armadilhas juntas ($p < 0,001$), embora a BGM tenha sido mais eficaz que a BGS ($p < 0,001$), resultado que também foi obtido no semicampo com a BGM capturando o dobro de mosquitos que a BGS ($p < 0,001$). A BGM capturou mais *Anopheles funestus s.l.*, vetor dominante no sudeste da Tanzânia, do que os outros métodos, inclusive a HLC, porém não houve diferença significativa. A superioridade da BGM em relação à BGS também foi demonstrada nos testes de filmagem, onde mais mosquitos voaram ao redor da BGM, com maior frequência e por mais tempo. Posteriormente, foi realizada uma comparação entre as BGMs iscadas com os atraentes Ifakara Blend (IB), Mbita Blend (MB5) e CO₂ (proveniente da fermentação de melaço de cana por *Saccharomyces cerevisiae*). Os experimentos em campo foram realizados na Tanzânia e no Brasil e o semicampo na Tanzânia, utilizando fêmeas de *An. arabiensis*. No Brasil, a adição de CO₂ elevou o número de *Ny. darlingi* capturados pelos atraentes IB e MB5 ($p < 0,05$). Na comparação entre o IB, MB5 e CO₂, não houve diferença significativa nas capturas de *An. arabiensis*, *An. gambiae s.l.* e *Ny. darlingi* em semicampo, campo na Tanzânia e campo no Brasil, respectivamente ($p > 0,05$). Ademais, no Brasil e na Tanzânia, foram comparadas BGMs iscadas com o IB em diferentes liberadores: (1) um novo liberador desenvolvido na UFMG, (2) o BG-Cartucho (Biogents Company) e (3) tiras de nylon. Nos testes realizados em campo no Brasil e semicampo na Tanzânia não houve diferença entre os tratamentos avaliados ($p > 0,05$), entretanto, no campo na Tanzânia, o BG-Cartucho capturou mais *An. gambiae s.l.* que os outros liberadores ($p < 0,001$). A BGM também foi avaliada como componente de um sistema *push-pull*, composto por um repelente espacial (o piretróide transflutrina (0,25g/m²) e a armadilha. O número de BGMs (1, 2 ou 4) e a sua distância em relação às casas experimentais no semicampo (5m, 15m ou 30m), foram avaliados. O sistema *push-pull* ofereceu maior proteção contra picadas de *An. arabiensis* do que seus componentes avaliados

individualmente, porém, a sua eficácia foi atribuída ao uso do repelente, havendo diferença somente quando comparado com o uso das armadilhas isoladas ($p < 0,05$). A melhor configuração do *push-pull* foi a do repelente com duas armadilhas instaladas a pelo menos 15m das casas. Assim, o presente trabalho avaliou a BGM de modo a fornecer informações que contribuam para a sua incorporação nos programas de monitoramento e controle de vetores da malária no Brasil e no mundo.

Palavras-chave: BG-Malária; Vetores de *Plasmodium spp.*; Monitoramento vetorial; *Push-pull*;

ABSTRACT

The BG-Malaria trap (BGM) was developed was conceived by adapting the BG-Sentinel trap (BGS), and it was demonstrated as efficient tool for sampling the main Brazilian malaria vector, *Nyssorhincus darlingi*, but it has not previously been tested for African malaria vectors. Thus, BGM was evaluated to collect African anophelines in experiments conducted in Tanzania, where it was compared to BGS and human landing catch (HLC) in field. In semi-field the comparison was done only against BGS with *Anopheles arabiensis* females from the Ifakara Health Institute colony. The *An. arabiensis* flight dynamics near both traps, BGM and BGS, was also evaluated in a video studio. In field, HLC caught more *Anopheles gambiae s.l.* than either trap ($p < 0.001$), although BGM was more effective than BGS ($p < 0.001$) and this result was also obtained in the semi-field with BGM catching twice as many mosquitoes as BGS ($p < 0.001$). BGM caught more *Anopheles funestus s.l.*, the dominant vector in southeastern Tanzania, than the other methods, including HLC, but there was no significant difference. BGM's superiority over BGS was also demonstrated in the filming tests, where more mosquitoes flew around BGM, more often and for longer. Subsequently, a comparison was made between BGMs baited with the attractants Ifakara Blend (IB), Mbita Blend (MB5) and CO₂ (from sugarcane molasses-yeast fermentation). Field experiments were conducted in Tanzania and Brazil and the semi-field in Tanzania with *An. Arabiensis* females. In Brazil, the addition of CO₂ increased the number of *Ny. darlingi* caught by IB and MB5 ($p < 0.05$). In the comparison between IB, MB5 and CO₂, there was no significant difference in the catches of *An. arabiensis*, *An. gambiae s.l.* and *Ny. darlingi* in semi-field, field in Tanzania and field in Brazil, respectively ($p > 0.05$). In addition, In Brazil and Tanzania, BGMs were compared when baited with IB dispensed by different dispensers: (1) a new dispenser developed at UFMG, (2) BG-Cartridge (Biogents Company) and (3) nylon strips. In the field tests in Brazil and semi-field in Tanzania, there was no difference between treatments evaluated in the semi-field and field in Brazil ($p > 0.05$), however, in the field in Tanzania, BG-Cartridge caught more *An. gambiae s.l.* than the other dispensers ($p < 0.001$). BGM was also evaluated as a component of a push-pull system, comprised of a spatial repellent (the pyrethroid transfluthrin (0.25g/m²)) and the trap. Number of BGMs (1, 2 or 4) and their distance (5m, 15m or 30m) from semi-field trial houses were evaluated. The push-pull system offered greater protection against *An. arabiensis* bites than its components individually evaluated, but its effectiveness was attributed to the use of the repellent, differing only when compared with the traps alone ($p < 0.05$). The best configuration of push-pull was comprised of the spatial repellent plus two traps, each at least 15m from houses. Therefore, the present work evaluated BGM in order to

provide information that contributes to its incorporation in malaria vector monitoring and control programs in Brazil and worldwide.

Keywords: BG-Malaria; *Plasmodium spp.* vectors; Vector surveillance; Push-pull.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa demonstrando os países com casos autóctones de malária em 2000 e seu status até 2017.....	19
Figura 2	Frequência (milhões) e prevalência dos casos de malária causados por <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i> por região em 2017.....	20
Figura 3	Ilustração representativa das modificações das traquéolas ovarianas antes e após a primeira oviposição.....	29
Figura 4	Ilustração da funcionalidade das armadilhas BG-Sentinel e BG-Malária.....	36
Figura 5	Cidade de Ifakara, região de Morogoro, sudeste da Tanzânia.....	44
Figura 6	Estrutura das áreas de semicampo do Ifakara Health Institute, localizado na cidade de Ifakara, região Kilombero, sudeste da Tanzânia.....	45
Figura 7	Mapa da área onde os experimentos em campo foram realizados, mostrando as vilas rurais nos distritos de Ulanga e Kilombero, na cidade de Ifakara, sudeste da Tanzânia.....	46
Figura 8	Mapa da área onde os experimentos em campo foram realizados, mostrando a localização das armadilhas no Ramal do Brasileirinho na zona periurbana, na cidade de Manaus – AM, região Norte do Brasil.....	46
Figura 9	Sistemas de liberação utilizados nas armadilhas BG-Malária e BG-Sentinel.....	49
Figura 10	Instalação das faixas de juta impregnadas com o piretróide Transflutrina nas casas da área de semicampo do Ifakara Health Institute, Tanzânia.....	50
Figura 11	Diagrama esquemático da posição das armadilhas e pontos de liberação dos mosquitos na área de semicampo.....	51
Figura 12	Diagrama esquemático da posição das armadilhas e pontos de liberação dos mosquitos na área de semicampo.....	53
Figura 13	Diagrama esquemático da posição das armadilhas e pontos de liberação dos mosquitos na área de semicampo.....	54
Figura 14	Diagrama esquemático da montagem dos experimentos no estúdio de filmagem.....	55
Figura 15	Distribuição do número de fêmeas de <i>Nyssorhynchus darlingi</i> capturadas por noite pelas armadilhas BGM, iscadas com diferentes atraentes, em campo no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM.....	128
Figura 16	Distribuição do número de fêmeas de <i>Anopheles arabiensis</i> recapturadas por noite pelas armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara blend liberado por diferentes liberadores, em semicampo no Ifakara Health Institute.....	130
Figura 17	Distribuição do número de fêmeas de <i>Nyssorhynchus darlingi</i> capturadas por noite pelas armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara blend liberado por diferentes liberadores, em campo no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM.....	132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Exemplos de armadilhas do tipo <i>bed nets</i> que utilizam humanos como isca.....	31
Quadro 2	Exemplos de armadilhas iscadas com atraentes sintéticos.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tratamentos utilizados nos experimentos de avaliação dos atraentes para serem utilizados na armadilha BG-Malária, realizados em Manaus (Brasil) e Ifakara (Tanzânia).....	52
Tabela 2	Estimativa da eficiência de amostragem de fêmeas de <i>Nyssorhynchus darlingi</i> capturadas por armadilhasvBG-Malária, iscadas com diferentes atraentes com e sem associação de CO ₂ , em relação ao controle.....	126
Tabela 3	Espécies de fêmeas de anofelinos capturadas por armadilhas BG-Malária, iscadas com diferentes atraentes, em campo, no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM e na Vila Minepa, zona rural de Ifakara, Tanzânia.....	127
Tabela 4	Espécies de fêmeas de anofelinos capturadas por armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara Blend liberados por diferentes liberadores em campo, no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM e na Vila Minepa, zona rural de Ifakara, Tanzânia.....	131
Tabela 5	Estimativa da eficiência de captura de fêmeas de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> por noite pelas armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara blend liberado por diferentes liberadores, em relação ao controle, em campo na Vila Minepa, zona rural de Ifakara, Tanzânia.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Estado do Amazonas
BG	Biogents Company
BGM	Armadilha BG-Malária
BGS	Armadilha BG-Sentinel
CDC	Armadilha luminosa – <i>Center on Disease Control</i>
CO₂	Gás dióxido de carbono
COMBRASIL	Associação de Produtores do Brasileirinho
EP	Erro Padrão
HLC	Captura por atração humana – <i>Human Landing Catch</i>
HSD de Tukey	Diferença Realmente Significativa de Tukey
IB	Atraente sintético Ifakara Blend
IC	Intervalo de Confiança
IHI	Ifakara Health Institute
IIQ	Intervalo Interquartil
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IRB	Institute Review Board
Lintec	Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo no Controle de Vetores
MB5	Atraente sintético Mbita Blend
MILD	Mosquiteiro Impregnados com Inseticida de Longa Duração
MLB	Armadilha Mosquito Landing Box
MLG	Modelos Lineares Generalizados
MMX	Armadilha Mosquito Magnetic X
MP	Membrana Polimérica
NIMR	National Institute for Medical Research
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBD	Polietileno de Baixa Densidade
PRI	Pulverização Residual Intradomiciliar
PVC	Policloreto de Vinila
RR	Risco Relativo
s.l.	<i>sensu lato</i>
s.s.	<i>sensu stricto</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VectorSphere	Laboratório de Vetores do Ifakara Health Institute

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Aspectos gerais sobre a malária	19
1.2 Vetores de plasmódios.....	20
1.2.1 Vetores dominantes no Brasil	22
1.2.2 Vetores dominantes na África.....	22
1.3 Controle de vetores.....	25
1.4 Monitoramento de vetores	27
1.4.1 Estimativa da idade: Exame de paridade	28
1.5 Armadilhas para captura de vetores	29
1.5.1 A armadilha BG-Malária	35
1.6 Atraentes sintéticos.....	36
1.7 Sistemas de liberação de odor.....	38
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41
3.1 Geral	41
3.2 Específicos.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Área de estudo.....	43
4.1.1 Tanzânia e Ifakara Health Institute.....	43
4.1.2 Locais dos experimentos.....	45
4.2 Mosquitos.....	47
4.3 Métodos utilizados para capturar mosquitos.....	47
4.4 Atraentes utilizados nas armadilhas	47
4.5 Sistemas de liberação de odores utilizados nas armadilhas.....	48
4.6 Equipamento de gravação e software para análise das imagens.....	49
4.7 Componentes do sistema <i>push-pull</i> : Transflutrina (<i>push</i>) e a BGM (<i>pull</i>)	50
4.8 Experimentos	50
4.8.1 Comparação entre diferentes métodos de captura para monitoramento de vetores africanos da malária.....	50
4.8.2 Avaliação do efeito da adição de CO ₂ aos atraentes IB e MB5	51
4.8.3 Comparação entre os diferentes atraentes testados na armadilha BG-Malária. 52	
4.8.4 Comparação entre os diferentes sistemas de liberação de atraentes testados na armadilha BG-Malária	53
4.8.5 Avaliação do comportamento de vôo de <i>Anopheles arabiensis</i> perante à armadilha BG-Malária	54
4.8.6 Avaliação do sistema <i>push-pull</i> para proteção contra picadas de <i>Anopheles arabiensis</i>	56
4.9 Processamento dos mosquitos coletados: triagem, identificação e exame da paridade	59
4.10 Análise dos dados.....	59

4.11 Considerações éticas.....	61
5. RESULTADOS	62
Dados não publicados:	62
Avaliação em campo do efeito da adição de CO ₂ aos atraentes IB e MB5.....	126
Comparação em campo dos atraentes IB, MB5 e CO ₂ para capturar anofelinos. ...	126
Comparação em semicampo entre a MP, BG-Cartucho e tiras de nylon como liberadores do atraente Ifakara Blend para capturar <i>An. arabiensis</i>	129
Comparação em campo entre aMP, BG-Cartucho e tiras de nylon como liberadores do atraente Ifakara Blend para capturar anofelinos.....	130
6. DISCUSSÃO	134
7. CONCLUSÕES.....	141
8. PERSPECTIVAS.....	142
9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	143
9.1 Produções resultantes da execução da tese	143
9.2 Produções resultantes das colaborações	143
10. REFERÊNCIAS.....	144
APÊNDICE.....	163
ANEXOS	167

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre a malária

Desde a descrição do parasito causador da malária no sangue humano realizada há mais de 130 anos por Charles Louis Alphonse Laveran, a infecção ocasionada por esse parasito ainda se mantém como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade¹. A malária existe em uma centena de países e territórios, particularmente os tropicais em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹, quase metade da população mundial corre o risco de contrair a doença, tendo sido registrados em 2017 nos 87 países endêmicos aproximadamente 219 milhões de casos e 435 mil óbitos, sendo a maioria dos casos em crianças menores de 5 anos (61%). A África retém 92% da incidência total e a maior parte dos óbitos (93%), seguida pelo Sudeste Asiático (5%) e regiões do Mediterrâneo Oriental (2%)¹. Nas Américas, Venezuela e Brasil respondem por 78% dos casos notificados, sendo que no Brasil o maior número de ocorrências é observado na região amazônica com aproximadamente 189 mil casos em 2017¹ (Figura 1).

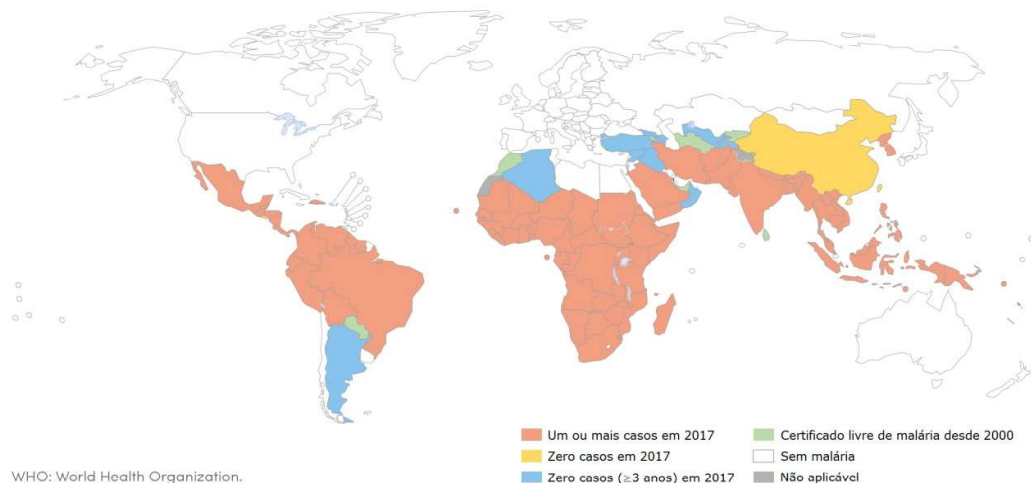


Figura 1. Mapa demonstrando os países com casos autóctones de malária em 2000 e seu status até 2017.

Países com zero casos nos últimos 3 anos consecutivos são certificados como livres de malária. Fonte: Adaptado de WHO¹.

Esta parasitose é causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Existem cinco espécies que infectam os seres humanos, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Embora o *P. falciparum*, o *P. vivax* e o *P. malariae* sejam

amplamente distribuídos, a ocorrência do *P. ovale* está restrita ao continente Africano² e o *P. knowlesi* aos países do Sudeste Asiático³, sendo este último considerado de caráter zoonótico e se mantém como a causa predominante da malária humana na Malásia^{4,5}. Além do *P. knowlesi*, recentemente outras espécies também descritas como causadoras de malária simiana foram associadas a casos de malária em humanos, como o *Plasmodium cynomolgi*, cuja primeira ocorrência de infecção natural em humanos foi descrita, em um único relato de caso na Malásia, por Ta e colaboradores⁶. Entretanto, mais casos de pessoas infectadas com o *P. cynomolgi* foram relatados recentemente, tanto em infecções sintomáticas mistas com o *P. knowlesi* na Malásia⁷, quanto em infecções assintomáticas no Camboja⁸. Na América do Sul, as espécies *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium* foram encontradas infectando naturalmente pessoas na Amazônia Venezuelana⁹ e na região da Mata Atlântica Brasileira¹⁰, respectivamente.

O *P. falciparum* e o *P. vivax* são as espécies que causam a maioria da morbidade e mortalidade por malária no mundo, sendo os principais alvos dos esforços de prevenção e controle da doença¹. A prevalência do *P. falciparum* é de 99,7% na África, 69% na região do Mediterrâneo Oriental e 62,8% no Sudeste da Ásia¹. No entanto, nas Américas a prevalência do *P. vivax* é de 74%, chegando a 90% no Brasil¹ (Figura 2).

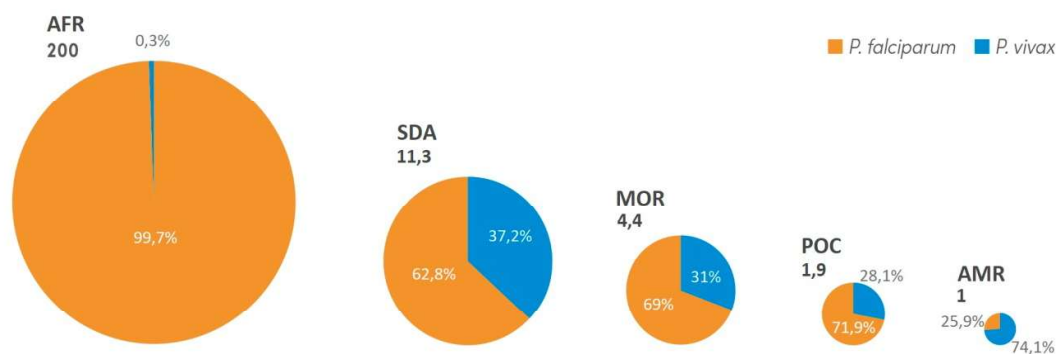


Figura 2. Frequência (milhões) e prevalência dos casos de malária causados por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) e *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) por região em 2017. AFR = Região da África; AMR = Região das Américas; MOR = Região do Mediterrâneo Oriental; POC = Região do Pacífico Ocidental; SDA = Região do Sudeste Asiático. Fonte: Adaptado de WHO¹.

1.2 Vetores de plasmódios

Os plasmódios são transmitidos por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. O gênero *Anopheles* possui um total de 412 espécies formalmente reconhecidas e vários membros não identificados de complexos de espécies que

não foram formalmente descritos¹¹. As espécies descritas desse gênero estão divididas em quatro subgêneros, *Anopheles* (185 espécies), *Baimaia* (1 espécie), *Cellia* (224 espécies) e *Christya* (2 espécies)¹¹. Recentemente, Foster, et al.¹²(2017) sugeriram a elevação de quatro subgêneros ao nível de gênero baseado em análises filogenéticas de genes codificadores de proteínas mitocondriais. Portanto, os atuais gêneros *Kerteszia*, *Lophopodomya*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia* possuem juntos 63 espécies formalmente descritas, sendo 40 delas pertencentes ao gênero *Nyssorhynchus*.

Mesmo com a vasta diversidade, somente cerca de 70 espécies são incriminadas como vetores de plasmódios em humanos e destas, 41 são consideradas vetores dominantes capazes de transmitir a malária em um nível de grande preocupação para a saúde pública¹³. A determinação da importância de uma espécie na transmissão da malária envolve diferentes critérios a serem avaliados, tais como a associação ecológica vetor/hospedeiro/parasito e a identificação da mesma espécie de *Plasmodium* em pacientes da mesma região geográfica¹⁴. A presença de oocistos no intestino médio de mosquitos indica a sua susceptibilidade aos parasitos e a descoberta de esporozoítos na glândula salivar pode atestar que o parasito completou seu ciclo, conseqüentemente, podendo ser transmitido a um novo hospedeiro¹⁴. Além disso, um outro parâmetro crucial é a preferência alimentar das fêmeas, visto que espécies antropofílicas são consideradas os vetores mais eficientes¹³. Entretanto, a maioria dos anofelinos são zoofílicos, podendo, na ausência de seus hospedeiros preferenciais ou em períodos de elevada densidade, se alimentar no homem¹⁵.

Como a ocorrência de determinada espécie em área endêmica está diretamente ligada às condições ambientais, diferentes espécies de anofelinos são reportadas como vetores dominantes em diferentes regiões. Por exemplo, no Sul Asiático, *Anopheles (Cel.) stephensi*, *Anopheles (Cel.) culicifacies*, *Anopheles (Cel.) fluviatilis*, *Anopheles (Cel.) minimus*, *Anopheles (Cel.) dirus*, *Anopheles (Cel.) aconitus* e *Anopheles (Cel.) maculatus* são os principais vetores de plasmódios^{13,16}, enquanto que no leste Asiático os principais vetores são *An. stephensi*, *Anopheles (Cel.) arabiensis* e *An. culicifacies*^{13,17}. Na América do Sul, os vetores dominantes compreendem espécies pertencentes ao gênero *Nyssorhynchus*, como os membros do complexo *Albitarsis* (*Nyssorhynchus albitarsis*, *Nyssorhynchus deaneorum*, *Nyssorhynchus janconae*, *Nyssorhynchus marajoara* e *Nyssorhynchus oryzalimnetes*), *Nyssorhynchus aquasalis* e o *Nyssorhynchus darlingi*, sendo esta última espécie a principal vetora de plasmódios no continente Americano^{13,18-20}.

1.2.1 Vetores dominantes no Brasil

No território brasileiro, são conhecidas 54 espécies de anofelinos, das quais poucas são incriminadas como vetoras de plasmódios²¹. Em determinados locais algumas espécies se destacam, como o *Ny. aquasalis* no estado do Pará e em áreas costeiras do Nordeste^{22,23} e duas espécies do gênero *Kerteszia*, *Kerteszia bellator* e *Kerteszia cruzii*, em regiões de mata atlântica^{24,25}. Além disso, espécies como *Nyssorhynchus nuneztovari* e *Nyssorhynchus triannulatus* são descritas como vetores secundários na região norte^{26,27}. As espécies do complexo *Albitarsis* são os *Nyssorhynchus* mais comuns no Brasil, estando amplamente distribuídas e relacionadas à transmissão da malária em vários locais^{19,28}, com destaque para as espécies *Ny. marajoara* que atua como principal vetora no estado do Amapá^{29,30} e *Ny. janconnae*, descrita como um vetor tão importante quanto o *Ny. darlingi* em Roraima^{31,32}.

Assim como no restante da América do Sul, o *Ny. darlingi* é o principal vetor de plasmódios no Brasil, onde a sua distribuição estende-se por todo o território, só não estando presente nas áreas secas do Nordeste, no extremo sul do país e em áreas de elevada altitude^{14,19,20,33}. É um vetor altamente adaptado a diferentes ambientes e sua importância está relacionada a diversas características de sua bionomia, como: (1) o hábito alimentar, que mesmo apresentando uma acentuada antropofilia é considerado um vetor oportunista que seleciona seus hospedeiros de acordo com a disponibilidade²⁹; (2) a flexibilidade no comportamento de hematofagia, podendo se alimentar e repousar dentro (endofágico/endofilico) ou fora (exofágico/exofilico) das residências com picos de atividade hematofágica nos períodos crepusculares^{20,33}; (3) a diversidade de criadouros (comumente associado a remansos de rios e riachos) caracterizados como grandes reservatórios de água pouco corrente, sombreados e com vegetação flutuante ou emergente^{20,34,35}, bem como criadouros artificiais recorrentes de mudanças ecológicas, tais como desmatamento³⁶, construção de hidrelétricas³⁷ e mineração^{20,38}; e (4) a rápida adaptação a novos ambientes resultantes da intervenção humana^{39,40}. Tais aspectos comportamentais podem levar ao aumento de sua capacidade vetorial e, possivelmente, a um maior risco de transmissão da malária³³.

1.2.2 Vetores dominantes na África

No continente Africano, três espécies pertencentes a dois complexos de espécies crípticas (*Anopheles gambiae sensu lato* e *Anopheles funestus sensu lato*) atuam como principais vetoras de plasmódios: *Anopheles (Cel.) gambiae sensu stricto*, *Anopheles (Cel.) arabiensis* e *Anopheles (Cel.) funestus sensu stricto*^{13,41}. As espécies dentro de cada complexo

são morfologicamente idênticas, mas isoladas em relação a reprodução e possuem ampla diversidade comportamental, o que é refletido diretamente em sua capacidade vetorial⁴².

O complexo *An. gambiae s.l.* é constituído por oito espécies, *An. gambiae s.s.*, *Anopheles (Cel.) amharicus*, *An. arabiensis*, *Anopheles (Cel.) bwambae*, *Anopheles (Cel.) coluzzii*, *Anopheles (Cel.) melas*, *Anopheles (Cel.) merus* e *Anopheles (Cel.) quadriannulatus*⁴³⁻⁴⁵. Além das duas espécies mencionadas anteriormente, as espécies *An. melas* e *An. merus* também são incriminadas como vetoras, porém são consideradas vetoras secundárias com pouca importância epidemiológica⁴¹. O *An. gambiae s.s.* é considerado o vetor mais eficiente do mundo e entre as características que o fazem ser tão notável, o elevado grau de antropofilia e endofagia se destacam⁴¹. Seu período de hematofagia é tarde da noite, com picos de atividade após as 22:00h e mais comumente entre a meia-noite e as primeiras horas da manhã⁴⁶. Essa espécie tem uma vida relativamente longa, entretanto, o período de desenvolvimento larval é curto, aproximadamente seis dias do ovo até a emergência do adulto, em condições ótimas de temperatura (~28°C)⁴⁷. Suas larvas frequentemente são encontradas em criadouros associados à atividade humana, tais como pegadas de cascos de animais, marcas de pneus e poças, sendo portanto, caracterizados como pequenas coleções de águas rasas e ensolaradas e devido à sua natureza temporária, possuindo pouca ou (regularmente) nenhuma vegetação⁴⁸⁻⁵⁰.

O *An. arabiensis*, outro vetor de extrema importância na transmissão da malária, assim como o *An. gambiae s.s.*, também pode exibir um comportamento antropofílico e endofágico, entretanto, manifesta uma acentuada plasticidade em seus hábitos, sendo preferencialmente exofágico, exofílico e oportunista, alimentando-se tanto em humanos quanto em animais^{51,52}. Seu período de hematofagia também varia ao longo da noite, porém apresentam picos de atividades no início da noite e início da manhã⁵³. Os habitats larvais dessa espécie se assemelham aos do *An. gambiae s.s.*, isto é, pequenas coleções de águas rasas, ensolaradas e temporárias. No entanto, a plasticidade de seus hábitos também se aplica aos criadouros, podendo igualmente utilizar grandes corpos d'água de fluxo lento e parcialmente sombreados, natural ou artificial, como as áreas de cultivo de arroz, onde a densidade larval está associada à altura do arroz, sendo elevada quando as plantas estão relativamente pequenas e reduzindo à medida que as plantas amadurecem^{50,54-56}.

Entre as 13 espécies que compõem o complexo *An. funestus s.l.*, 10 são formalmente reconhecidas e três ainda não foram formalmente descritas¹¹. As espécies descritas são *An. funestus s.s.*, *Anopheles (Cel.) aruni*, *Anopheles (Cel.) confusus*, *Anopheles (Cel.) parensis*, *Anopheles (Cel.) vaneedeni*, *Anopheles (Cel.) longipalpis*, *Anopheles (Cel.) leesoni*,

Anopheles (Cel.) rivulorum, *Anopheles (Cel.) brucei* e *Anopheles (Cel.) fuscivenosus*⁵⁷. Dentre elas, *An. funestus s.s.* é a predominante, tanto em abundância quanto na distribuição geográfica, além de ser a principal vetora do complexo^{58,59}. As espécies *An. leesoni* e *An. rivulorum* também já foram encontradas infectadas com o *P. falciparum*, porém em menor escala, sendo a última também incriminada como vetora^{60,61}. O *An. funestus s.s.*, em comparação com os outros vetores dominantes na África, manifesta uma maior estabilidade em seus hábitos, sendo prevalentemente antropofílicos e endofágicos, com o período de maior atividade hematofágica semelhante ao do *An. gambiae s.s.*, com as fêmeas se alimentando tarde da noite⁵⁷. O comportamento de repouso endofílico também é frequente, o qual combinado com a sua acentuada antropofilia e a alta longevidade, o tornam um vetor tão bom quanto o *An. gambiae s.s.*^{57,62,63}. Suas larvas se criam em grandes reservatórios de água de caráter permanente ou semi-permanente e com vegetação emergente, como pântanos e bordas de lagos⁴¹. Em algumas localidades, também utiliza áreas de cultivo de arroz, assim como o *An. arabiensis*, porém há uma sucessão temporal entre essas espécies durante o crescimento das plantas, no qual as larvas de *An. funestus s.s.* atingem o pico de maior densidade em campos com plantas mais velhas, em maturação, ao contrário das condições abertas com plantas jovens utilizadas pelas larvas de *An. arabiensis*^{56,64,65}.

A diversidade comportamental entre as populações de vetores tem um impacto direto na suscetibilidade aos métodos de controle. A acentuada antropofilia, endofagia e endofilia manifestada pelo *An. gambiae s.s.* o torna estritamente dependente dos seres humanos e ao mesmo tempo que essas características o fazem ser um vetor tão potente, também são a sua maior fraqueza^{66,67}. A utilização em larga escala dos Mosquiteiros Impregnados com Inseticida de Longa Duração (MILD) e da Borrifação Residual Intradomiciliar (BRI) resultou em uma grande redução na população de *An. gambiae s.s.*⁶⁸, modificando a composição das espécies de vetores em muitos países da África Subsaariana, como o Quênia⁶⁹ e a Tanzânia⁷⁰, onde essa espécie se tornou escassa em diversos locais e o *An. arabiensis* vem sendo descrito como o vetor mais abundante⁷¹⁻⁷⁴. Apesar disso, o *An. funestus*, que ocorre em densidades muito mais baixas do que o *An. arabiensis*, foi relatado como o vetor mais dominante no sudeste da Tanzânia, sendo responsável pela transmissão de cerca de nove em cada dez novos casos de malária na região⁷⁵. Ademais, enquanto o *An. arabiensis* apresenta um comportamento oportunista, alimentando-se tanto em humanos como em animais⁵³, o *An. funestus* preferencialmente se alimenta em humanos e um aumento na sua densidade populacional, bem como na sua taxa de infecção, pode, conseqüentemente, aumentar a endemicidade da malária na região^{76,77}.

1.3 Controle de vetores

O controle vetorial é um componente essencial na prevenção da malária e se baseia no uso de metodologias para evitar o contato vetor-humano. Em relação aos vetores de plasmódios, a OMS recomenda como principais ferramentas de controle vetorial o uso de MILDs e BRI⁷⁸. Ferramentas estas cujo uso já é bem estabelecido e a ampla cobertura em comunidades vulneráveis à transmissão da malária foi responsável por 68% da grande redução no número de casos da doença entre os anos de 2000 e 2015⁷⁹.

Os MILDs são mosquiteiros que possuem a tela impregnada com piretróides, cujo modo de ação é repelir ou matar os mosquitos que entrarem em contato com o inseticida⁸⁰. Além de proteger o usuário, o MILD também produz um “efeito comunitário” ao proteger indiretamente os membros de uma comunidade pelo impacto na longevidade dos mosquitos^{81,82}, conseqüentemente, em sua capacidade vetorial, que é o conjunto de características intrínsecas do vetor que, associadas à aspectos do ambiente, contribuem para a transmissão de patógenos¹⁴. Os MILDs são tratados apenas com piretróides⁷⁸, devido, principalmente, à sua baixa toxicidade para humanos, quando utilizado em dosagens baixas, e também ao seu modo de ação nos mosquitos, tais como repelência, efeito *knock-down* (paralisa imediata) e inseticida⁸³. Entretanto, devido à gradativa resistência dos anofelinos aos piretróides, como relatado em vários países africanos⁸⁴, a OMS recomenda o uso de MILDs tratados com piretróides em associação com butóxido de piperonila (PBO – do inglês *piperonyl butoxide*)⁷⁸, um composto orgânico sinergista que, mesmo não apresentando nenhuma atividade inseticida, potencializa o efeito dos piretróides. A redução da resistência e, em alguns casos, restauração da suscetibilidade aos piretróides foi observado em *An. arabiensis* expostos à combinação piretróide/PBO em Zanzibar (Tanzânia)⁸⁵. Da mesma forma, o aumento da mortalidade foi observado em mosquitos expostos à MILDs com PBO em comparação aos MILDs convencionais, em diversos estudos realizados em outros países africanos, como Costa do Marfim⁸⁶, Camarões^{87,88}, Benin^{87,88} e Burkina Faso⁸⁷.

Por sua vez, a outra ferramenta padrão de controle vetorial recomendada pela OMS, a BRI, consiste na aplicação de um inseticida de atividade residual em superfícies no interior das residências, em locais onde, possivelmente, os anofelinos repousariam e pudessem entrar em contato com tais inseticidas. É recomendado que esse efeito residual dos inseticidas utilizados seja de pelo menos três meses após a aplicação⁸⁹. As formulações pré-qualificadas pela OMS para a BRI estão inseridas em cinco classes de inseticidas que agem de três formas nos vetores: (i) moduladores do canal de sódio: piretróides e organoclorados; (ii) inibidores da acetilcolinesterase: organofosforados e carbamatos; e (iii) moduladores competitivos de

receptores nicotínicos de acetilcolina: neonicotinóides⁷⁸. Quando aplicada corretamente, essa intervenção é uma poderosa arma para diminuir a população de vetores e, portanto, reduzir a transmissão da malária. Uma das histórias de maior sucesso da BRI foi a campanha realizada na década de 1940 no Brasil, a qual resultou numa grande redução na transmissão da malária no país, principalmente devido à aplicação de diclorodifeniltricloroetano (DDT), o qual teve seu uso proibido no país a partir de 2009, devido às características nocivas à saúde humana⁹⁰. Na Uganda, a BRI foi associada à uma redução significativa da morbidade da malária nos três primeiros meses após a aplicação⁹¹. O mesmo impacto positivo na transmissão da malária devido ao uso da BRI também foi demonstrado no Zimbábue⁹², no Zâmbia⁹³, em Gana⁹⁴, assim como em vários outros países⁹⁵.

Tanto os MILDs quanto a BRI são intervenções aplicáveis no ambiente intradomiciliar e a sua eficácia está condicionada ao comportamento das espécies-alvo, pois os vetores precisam se alimentar e repousar no interior das residências. Dessa forma, espécies exofágicas e exofílicas não são apropriadamente alcançadas por esse método. Por exemplo, o horário de maior atividade de hematofagia no período em que as pessoas estão dormindo e o subsequente repouso no interior das residências, são características que tornam as fêmeas de *An. gambiae* s.s. vulneráveis ao controle com essas intervenções^{68,69}. Por outro lado, devido aos versáteis hábitos alimentares do *An. arabiensis*, o contato com tais intervenções pode ser evitado ao se alimentarem no ambiente peridomiciliar em animais ou em pessoas desprotegidas^{52,53}, ou até mesmo, escapando rapidamente do interior das residências após a hematofagia por aberturas como frestas ou espaços entre a parede e o telhado que são comuns em residências africanas em zonas rurais⁹⁶.

Por estas razões, a OMS recomenda a utilização de ferramentas que possam complementar as intervenções supracitadas, ampliando seu raio de ação⁷⁸. Recentemente, Williams, et al.⁹⁷ publicaram uma revisão sobre métodos complementares de controle de vetores e reportaram sete ferramentas que apresentaram potencial para reduzir a transmissão da malária em estudos realizados em comunidades endêmicas, das quais incluem roupas impregnadas com inseticidas, manejo de criadouros e aplicação de larvicidas, melhorias em residências (fechamento de frestas, instalação de telas em portas e janelas, entre outros), repelentes tópicos e repelentes espaciais. Mesmo não havendo evidências do impacto na transmissão da malária, um dos métodos mais utilizado no Brasil é a borrifação espacial de inseticidas de ação rápida⁹⁸, que tem como alvo vetores que apresentam comportamento exofágico e exofílico, podendo ser aplicada em forma de nebulização térmica (“fumacê”) ou dispersão a frio de aerossóis por pulverizadores de mão ou mochila, veículos terrestres ou

meios aéreos⁹⁹. Entretanto, esta é uma medida emergencial em resposta a epidemias ou surtos, não sendo recomendado seu uso de forma rotineira em programas de controle vetorial.

Em relação aos repelentes tópicos, compostos aplicados diretamente na pele, o seu uso efetivamente evita o recebimento de picadas, porém protegem apenas os usuários, podendo aumentar o número de picadas em indivíduos que não estão usando os produtos. Essa característica associada à necessidade de reaplicação, tem grande impacto nesse tipo de intervenção, uma vez que sua eficácia se torna de responsabilidade pessoal do usuário. Repelentes espaciais, por sua vez, são compostos dispersos no ar para criar um ambiente livre de mosquitos e protegem indivíduos em uma determinada área¹⁰⁰, funcionando de maneira diferente dos repelentes tópicos, uma vez que os mosquitos podem se mover de indivíduos protegidos para indivíduos que não estão protegidos¹⁰¹. Uma outra vantagem dos repelentes espaciais é que eles podem ser utilizados de diferentes formas e novos métodos para sua distribuição estão sendo cada vez mais desenvolvidos, como é caso das faixas de tecido juta¹⁰²⁻¹⁰⁴, as quais ofereceram pelo menos 80% de proteção contra picadas sem demonstrar nenhum desvio de mosquitos para não usuários em um raio de até 80m¹⁰³. As faixas de juta dispersam os compostos de forma passiva, sem necessidade de energia externa para vaporização¹⁰⁴, além de demonstrarem um alto nível de absorção do piretróide transflutrina, um dos compostos mais amplamente utilizados como repelente espacial, podendo manter a eficácia por até seis meses^{103,104}. Ademais, as faixas de juta tratadas com transflutrina tiveram uma grande aceitação em comunidades rurais no sudeste da Tanzânia¹⁰⁵, evidenciando que esse tipo de intervenção pode ser aplicável em larga escala em todos os tipos de locais, incluindo comunidades de baixa renda ou remotas.

1.4 Monitoramento de vetores

O monitoramento vetorial é um componente importante da vigilância epidemiológica das doenças e consiste na utilização de métodos de coleta para estimar as características populacionais dos vetores. Os conhecimentos gerados pelo monitoramento são fundamentais para o emprego de medidas de prevenção e controle, uma vez que essas medidas ao serem adotadas devem levar em consideração o conhecimento prévio da área onde serão aplicadas, bem como a ecologia e o comportamento dos mosquitos. Em áreas endêmicas, por exemplo, a época mais crítica em que pode ocorrer maior transmissão, poderá ser prevista pelos dados obtidos de coletas sistematizadas durante o ano.

A finalidade do monitoramento determinará o método a ser empregado e em se tratando de culicídeos, os dois ambientes utilizados em seu ciclo biológico, aquático e

terrestre, exigem ferramentas distintas para capturar as formas imaturas (larvas e pupas) e adultas. A captura de imaturos de anofelinos é realizada de forma ativa e uma concha é o instrumento utilizado em grandes coleções de água, podendo ser de tamanho variado, geralmente comportando de 500 mL a um litro, e equipadas com cabos curtos ou longos de acordo com a dimensão do criadouro. Enquanto que em pequenos reservatórios, como axilas de plantas (ex. bromélias) ou pequenos recipientes, a coleta é realizada com o auxílio de um conta-gotas ou uma pipeta Pasteur^{106,107}.

O monitoramento de adultos é o método mais indicado para estimar parâmetros entomológicos importantes na dinâmica de transmissão da malária, pois fornece uma estimativa mais sensível das características das populações de vetores¹⁴. Os procedimentos para a realização da captura de formas adultas se baseiam em técnicas de busca ou atração, nos quais os mosquitos são capturados nos locais onde se encontram ou após serem atraídos por determinados estímulos conhecidos como “iscas”. A técnica de busca ativa captura mosquitos que permanecem inativos em abrigos durante certo período, isto é, durante intervalos após a eclosão, a cópula ou o repasto sanguíneo (abrigo pós-prandial), utilizando mecanismos de aspiração que podem ser individuais (ex. aspirador manual de Castro) ou coletivos (ex. aspirador mecânico de Nasci)^{14,108,109}.

Embora passem a maior parte do tempo em abrigos, usualmente os mosquitos são mais atraídos do que buscados e esse tipo de captura utiliza estímulos que podem ser naturais (ex. Humanos e outros animais) ou artificiais (ex. Luz e odores sintéticos) para atrair as fêmeas ao local de realização da captura. O método mais eficaz para capturar anofelinos adultos é a Atração Humana, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, sendo considerado padrão ouro para o monitoramento¹¹⁰⁻¹¹². A captura por atração humana, anteriormente denominada *isca humana*, consiste em um indivíduo expor os membros inferiores e esperar os mosquitos se aproximarem e pousarem para, então, capturá-los com um aspirador manual, idealmente antes de serem picados. Embora continue a ser o método mais preciso para determinar parâmetros entomológicos essenciais, devido a dilemas éticos que envolvem a exposição do agente de coleta a picadas de mosquitos potencialmente infectados, a atração humana tem sido rigorosamente limitada, motivando cada vez mais a criação de novas metodologias para a amostragem de anofelinos.

1.4.1 Estimativa da idade: Exame de paridade

A classificação da paridade é uma prática bastante utilizada no monitoramento vetorial e pode indicar a distribuição etária das populações de anofelinos, sendo possível estimar a

idade fisiológica das fêmeas a partir da análise das modificações em seu aparelho reprodutor¹¹³. Detinova¹¹⁴ sugeriu que o diagnóstico da paridade pode ser realizado pela observação da aparência dos filamentos traqueolares que cobrem os ovários, devido as alterações permanentes sofridas após a primeira oviposição. Em fêmeas que ainda não realizaram a oviposição (nulíparas), esses filamentos possuem um aspecto emaranhado, com suas terminações apresentando-se enoveladas e à medida que as fêmeas progridem em seu primeiro ciclo gonotrófico, devido ao aumento dos ovários, as traquéolas também aumentam de tamanho, desenrolando os novelos. Assim, após a primeira oviposição, as fêmeas agora oníparas apresentam os novelos desfeitos, com suas terminações retas, conforme ilustrado na figura 3¹⁴. A análise da proporção de fêmeas oníparas possui uma elevada importância em estudos epidemiológicos, pois a longevidade é um dos parâmetros entomológicos utilizados para avaliar a capacidade vetorial de uma espécie, visto que fêmeas mais velhas podem indicar que uma população viveu o suficiente para conter esporozoítos¹¹⁵. Além disso, a composição etária das populações também pode ser utilizada para avaliar o impacto de um programa de controle vetorial empregado em um determinado local¹¹⁶⁻¹¹⁸.

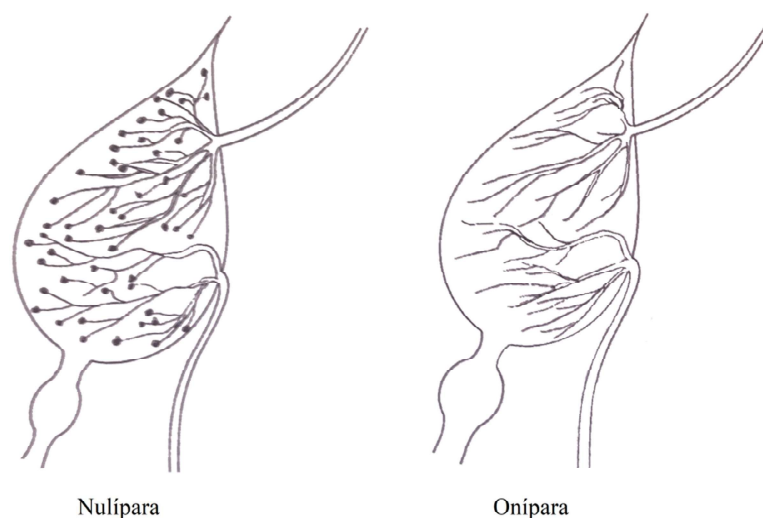


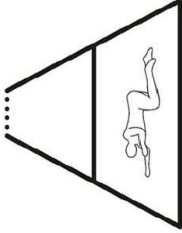
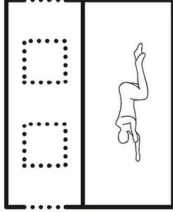
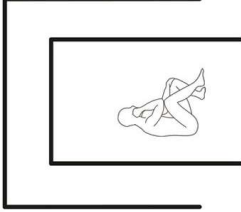
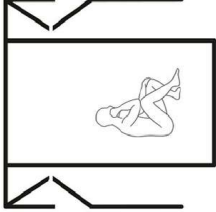
Figura 3. Ilustração representativa das modificações das traquéolas ovarianas antes (Nulípara) e após (Onípara) a primeira oviposição. Os ovários das fêmeas nulíparas possuem as ramificações traqueolares enoveladas, enquanto as fêmeas oníparas apresentam as ramificações traqueolares distendidas. Fonte: Adaptado de Forattini¹⁴.

1.5 Armadilhas para captura de vetores

Para mosquitos antropofílicos, os mais eficientes em transmitir a malária, não há uma forma mais produtiva de captura do que o uso de um humano como atraente^{119,120}. No entanto,

as limitações ao uso da captura por atração humana proporcionaram várias tentativas de aprimorar essa técnica através do aumento da proteção para os indivíduos que realizam a captura, dando origem a armadilhas denominadas “*bed nets*”, cujos princípios se baseiam nos mesmos da atração humana, nos quais o próprio homem é utilizado como isca, porém sem que haja contato direto com os mosquitos¹²¹⁻¹²⁶. O quadro 1 apresenta exemplos de armadilhas *bed nets* que dispõem do mesmo design básico, duas câmaras separadas por telas, onde uma possui aberturas que possibilitam a entrada dos mosquitos na armadilha e a outra é fechada, com espaço suficiente para comportar uma pessoa, cujos odores atrairão os mosquitos.




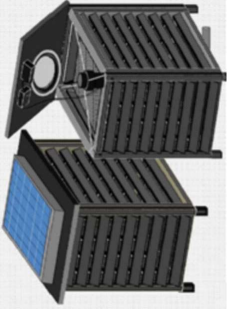
Quadro 1. Exemplos de armadilhas do tipo *bed nets* que utilizam humanos como isca.


Armadilha	Ilustração*	Local	Espécie alvo	Características	Referência
Mbita Trap		Quênia	<i>An. gambiae s.s.</i>	Confeccionada de tecido branco de algodão em formato cônico com o ápice invertido, formando um funil com um orifício para a entrada dos mosquitos. A câmara inferior é equipadada com um elástico na borda inferior para fixar a armadilha a um colchão.	Mathenge, et al. ¹²¹
Ifakara Tent Trap		Tanzânia	<i>Anopheles gambiae s.l.</i> e <i>An. funestus s.l.</i>	Possui formato retangular, revestida externamente por lona verde, contém seis entradas quadradas externamente e em forma de funil internamente. A divisão interna é constituída por uma camada de tela de fibra de vidro revestido com Teflon equipada com um zíper que permite que o agente de coleta capture os mosquitos de dentro da armadilha.	Govella, et al. ¹²²
HDN (<i>Human-baited Double Net</i>)		Laos	<i>Anopheles spp.</i> , <i>Aedes spp.</i> e <i>Culex spp.</i>	Composta por uma câmara retangular interna, confeccionada de tela de poliéster na cor azul, e uma câmara retangular externa levantada 30 cm acima do solo para permitir a entrada dos mosquitos no espaço entre os dois compartimentos.	Tangena, et al. ¹²⁴
Mosqntent		Brasil	<i>Ny. marajoara</i> e <i>Ny. darlingi</i>	Consiste em uma câmara interna, cercado por uma câmara externa levantada a 10 cm do chão, onde os mosquitos entram e ficam presos. Os mosquitos também entram por uma aba superior na parede da câmara externa, que consiste em um corte trapezoidal e uma fileira longitudinal de orifícios.	Lima, et al. ¹²⁵

*Fonte: Lima, et al.¹²⁵.

Embora esses exemplos de armadilhas apresentadas no quadro 1 operem de uma forma semelhante à captura por atração humana, mesmo com a proteção, a possibilidade de estarem sujeitas a viés de erro ainda existe, devido à diferença de atratividade entre os indivíduos utilizados¹²⁷, o que dificulta a padronização de tais métodos. Além disso, o uso dessas armadilhas continua sendo motivo de preocupação, pois mesmo que o risco de receber picadas infectantes tenha sido reduzido, diminuindo assim as preocupações éticas, a presença do coletor durante parte ou toda a noite ainda é exigida. Nesse contexto, a utilização de armadilhas que utilizem atraentes sintéticos que simulam odores humanos sem expô-los a riscos, pode ser uma alternativa a essas metodologias. Tais armadilhas vêm sendo desenvolvidas e avaliadas na tentativa de se obter um método de captura que seja eficiente, sensível e possa avaliar os parâmetros entomológicos tão precisamente quanto a atração humana, para, possivelmente, substituí-la com segurança¹²⁸⁻¹³⁰. Isto posto, um resumo das principais armadilhas iscadas com atraentes sintéticos é apresentado no quadro 2.

Quadro 2. Exemplos de armadilhas iscadas com atraentes sintéticos.

Armadilha	Imagem	Espécie alvo	Atraente	Características	Referência
Mosquito Magnetic X (MM-X)		<i>Anopheles</i> spp.	CO ₂ e Octenol	Possui dois ventiladores, um para liberar o ar e formar a pluma de odor e outro para a sucção dos mosquitos que se aproximam da entrada da armadilha.	Kline ¹³¹
BG-Sentinel [®]		<i>Aedes aegypti</i>	BG-Lure [®]	Apresenta uma forma cilíndrica e coloração branca, o odor sintético é dissipado para o meio através de ventilador interno que aspira o ar de fora da armadilha para o interior, fazendo com que esse entre em contato com o atraente sintético e saia da armadilha pela parte superior.	Kroeckel, et al. ¹³²
Ifakara Odor-baited Station		<i>Anopheles gambiae</i> s.l.	Ifakara Blend e CO ₂	É uma caixa de lona de 4 m ³ em forma de cabana com sete aberturas, duas das quais podem ser equipadas com armadilhas de intercepção para pegar os mosquitos que estão saindo. Utiliza odores humanos sintéticos como atraentes e pode ser complementada com contaminantes, incluindo inseticidas tóxicos ou agentes biológicos.	Okumu, et al. ¹³³
Mosquito Landing Box		<i>Anopheles gambiae</i> s.l.	Meias de nylon com odor humano e CO ₂	É uma caixa de madeira (70 x 70 x 80 cm) posicionada acima de pés de 10 cm de altura. O atraente é dissipado através de um tubo de PVC de 20 cm de comprimento e 5,7 cm de diâmetro localizado no interior da armadilha, um ventilador é utilizado para sugar o ar externo para que o mesmo entre em contato com o atraente e produza a pluma de odor.	Matowo, et al. ¹³⁴

<p>BG-Suna</p>		<p><i>Anopheles gambiae</i> s.l.</p>	<p>Mbita Blend e CO₂</p>	<p>Possui 5 componentes: um funil e ventilador de 12 volts, tubo de liberação de atraente, base de plástico perfurada, saco coletor, tripé e tampa de plástico em forma de cone. O ventilador suga ar para dentro da armadilha através do funil a uma velocidade de 3,1 m/s, abrindo a tampa na entrada da armadilha, a medida que o ar circula entra em contato com o atraente e sai através da base perfurada.</p>	<p>Hiscox, et al.¹³⁵</p>
----------------	---	--------------------------------------	---	--	-------------------------------------

1.5.1 A armadilha BG-Malária

As armadilhas atuais utilizadas para capturar vetores de plasmódios foram, em sua maioria, desenvolvidas e testadas para anofelinos africanos levando em consideração aspectos da ecologia e comportamento dessas espécies. No entanto, para *Ny. darlingi* o número de estudos nessa área ainda é escasso, sendo sua coleta feita com armadilhas generalistas ou, frequentemente, com atração humana¹³⁶. Um trabalho pioneiro no Brasil foi realizado por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais ao desenvolverem a armadilha BG-Malária (BGM)¹²⁸.

A BGM foi concebida a partir de adaptações realizadas na armadilha BG-Sentinel (BGS)¹³², envolvendo modificações físicas (cor, posição de instalação e altura do solo) e químicas com a substituição do atraente sintético BG-Lure (composto por amônia, ácido láctico e ácido caprótico) por gelo seco como fonte do gás dióxido de carbono (CO₂)¹²⁸. Ambas as armadilhas possuem formato cilíndrico, com 35cm de diâmetro e 40cm de comprimento, contendo no interior um tubo coletor (12cm de diâmetro x 30cm de comprimento) e um saco para reter os mosquitos. Um ventilador elétrico com 14 cm de diâmetro e alimentado por uma bateria de 12V, produz uma corrente de ar que expelle o odor das iscas utilizadas pela cobertura de gaze e arrasta para dentro das armadilhas os mosquitos que se aproximam do tubo coletor^{128,132}. A modificação no modo de instalação da BGS inverteu a corrente de ar gerada pelo ventilador, que de descendente passou a produzir uma sucção ascendente na BGM, cuja instalação é realizada com a abertura voltada para baixo aaproximadamente, 40 cm acima do solo (Figura 4). Essas adaptações foram consideradas mais efetivas que outras armadilhas comerciais testadas, incluindo a própria BGS e a armadilha do tipo CDC, capturando uma quantidade de *Ny. darlingi* semelhante à captura por atração humana, em experimentos realizados em campo no estado do Pará e em Rondônia¹²⁸.

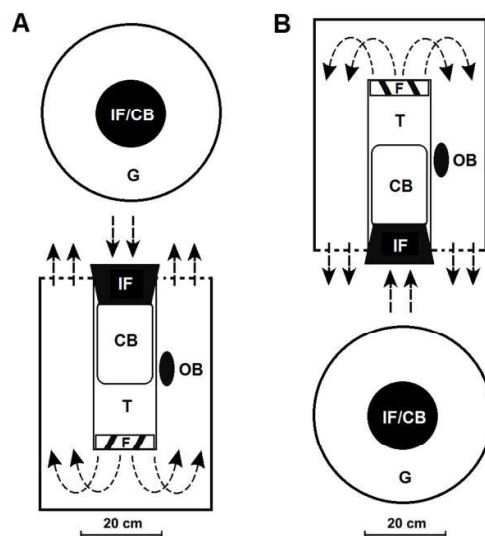


Figura 4. Ilustração da funcionalidade das armadilhas BG-Sentinel (A) e BG-Malária (B). Vista frontal e superior (círculos). IF = Tubo coletor; CB = Saco para coletar os mosquitos; F = Ventilador; G = Cobertura de gaze; RC = Recipiente para CO₂; OB = Atraente sintético. Setas indicam o fluxo de ar. Fonte: Adaptado de Kroeckel, et al.¹³² e Gama, et al.¹²⁸.

Desde o seu desenvolvimento, novas modificações buscando o aumento da eficiência de captura da BG-Malária foram realizadas e avaliadas por Rodrigues, et al.¹³⁷ e Leal¹³⁸, onde o primeiro desenvolveu um novo sistema de contenção de mosquitos (cilindro de acrílico) para substituir o saco coletor e o segundo avaliou o efeito da temperatura e a substituição do CO₂ por odores humanos naturais retidos em meias e camisas. O novo sistema de contenção proposto por Rodrigues, et al.¹³⁷ diminuiu os danos causados pelo saco coletor que impediam a identificação dos espécimes capturados, porém, ao comparar em campo a BGM à captura por atração humana, os resultados não foram tão satisfatórios quanto os obtidos por Gama, et al.¹²⁸, com a atração humana capturando duas vezes mais anofelinos¹³⁹. No estudo de Leal¹³⁸, apesar da temperatura e os odores naturais não terem aumentado a efetividade da BGM, foi possível observar a grande abundância de anofelinos que a armadilha é capaz de capturar. Embora os resultados desses estudos tenham se mostrado controversos, a armadilha apresenta um grande potencial para substituir a captura por atração humana.

1.6 Atraentes sintéticos

A probabilidade dos mosquitos vetores transmitirem com sucesso os parasitos a um novo hospedeiro depende da sua capacidade de localizá-lo para realizar a alimentação sanguínea¹⁴⁰⁻¹⁴². Os mosquitos que apresentam comportamento antropofílico evoluíram para buscar e se alimentar em humanos devido à sua capacidade de discernir compostos voláteis humanos de outros animais, orientando-se em direção aos hospedeiros a grandes distâncias¹⁴³.

O corpo humano produz inúmeros compostos voláteis, dos quais vários já foram identificados como atraentes que modulam o comportamento dos mosquitos e aqueles que manifestam comportamento antropofílico são capazes de detectar pequenas quantidades para encontrar o hospedeiro¹⁴⁴⁻¹⁴⁹. Esses compostos são classificados como cairomônios, isto é, compostos químicos que mediam a interação entre organismos de espécies distintas, evocando no organismo que percebe tais compostos uma resposta favorável e ao organismo emissor uma resposta desfavorável¹⁵⁰. Estudos do sistema olfativo de insetos levaram ao desenvolvimento de compostos químicos sintéticos para serem utilizados em armadilhas, entre eles destacam-se o ácido láctico, a acetona, a amônia, o ácido capróico (ou hexanóico), o octenol (1-octen-3-ol) e o gás carbônico (CO₂)¹⁵¹⁻¹⁵⁵.

Entre os compostos sintéticos, o CO₂ é o mais comumente utilizado em armadilhas^{128,137,156,157}. Foi reconhecido como atraente de mosquitos no final da década de 1930 e está relacionado com a ativação do vôo quando as fêmeas de mosquitos necessitam encontrar um hospedeiro para a realização do repasto sanguíneo¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Desde então, sua utilização como isca em armadilhas tem sido bem estabelecida. Por exemplo, o uso da armadilha do tipo CDC sem sua luz original, mas com CO₂ aumentou significativamente seu rendimento^{162,163}. Outros exemplos de armadilhas que funcionam bem usando somente CO₂ como isca são BGS, MM-X e a própria BGM^{128,137,164-166}.

Entretanto, sabe-se que ocorre um sinergismo na utilização de outras substâncias juntamente com o CO₂^{165,167,168}. A combinação do CO₂ com substâncias como amônia, ácido láctico e ácidos carboxílicos aumentou significativamente a quantidade de anofelinos africanos capturados em armadilhas^{155,169,170}. Outras substâncias como o octenol, ácido tetradecanóico e outros ácidos carboxílicos, entre outros compostos derivados do suor e expiração humanos, também foram relatadas agindo sinergicamente com o CO₂^{163,171,172}.

Vários desses compostos foram sintetizados e misturados, formando atraentes sintéticos que simulam o odor de uma pessoa^{155,169,173,174}. Testes em laboratório revelaram que uma mistura padrão de amônia, ácido láctico e ácidos carboxílicos é atraente para *An. gambiae s.l.*^{155,169}, e em testes em campo essa mistura atraiu mais mosquitos quando o CO₂ foi adicionado¹⁶⁵. Mesmo sendo menos eficaz do que o odor humano natural¹⁷⁵, tal combinação de compostos pode ter seu efeito atrativo melhorado pela adição de outros compostos¹⁶⁹. Por exemplo, a adição de 3-metil-1-butanol triplicou as capturas de *An. gambiae s.l.* em semicampo^{169,176}. Okumu, et al.¹⁷⁴ ao adicionarem à mistura padrão, além do CO₂, uma série de outros ácidos carboxílicos, conseguiram formular um odor sintético altamente atraente, denominado Ifakara Blend (IB), que em testes em campo capturou de 3 a 5 vezes mais *An. gambiae s.l.* do que a HLC. Não apenas a composição do atraente, mas também a

concentração dos compostos nele utilizados, tem um efeito crítico na atratividade dos mosquitos, como demonstrado por Mukabana, et al.¹⁷³ em experimentos no Quênia. Esses autores desenvolveram a formulação do atraente sintético Mbita Blend (MB5), que atraiu tanto *An. gambiae s.l.* quanto os próprios humanos e se mostrou mais eficiente do que o Ifakara Blend¹⁷³.

1.7 Sistemas de liberação de odor

O sucesso das armadilhas que utilizam odores sintéticos como isca também é influenciado pelos sistemas de liberação desses odores. A seleção dos materiais para liberar os caioimônios deve levar em consideração a garantia da estabilidade e longevidade dos atraentes, isto é, o tempo que o atraente se mantém viável no ambiente.

A grande maioria dos estudos com liberadores de odores são voltados para o controle de pragas agrícolas e, de forma geral, podem ser classificados em três tipos: formulações líquidas para pulverização, liberadores de matriz sólida e reservatórios de formulações¹⁷⁷. As formulações pulverizáveis são formadas por uma matriz líquida e (geralmente) biodegradável, na qual os compostos são dissolvidos e podem ou não conter outras substâncias para proteger os compostos odoríferos, como antioxidantes e surfactantes¹⁷⁷. Nos liberadores de matriz sólidas, os compostos são incorporados aos materiais e os mais comumente utilizados são tubos, sachês e frascos de polietileno^{178,179}, polímeros espirais¹⁸⁰, filmes de polímeros¹⁸¹, septos e pavios de borracha^{182,183}, polivinil cloreto (PVC)¹⁸⁴, fibras ocas¹⁸⁵, matrizes derivadas de zeólito¹⁸⁶ e matrizes de cera ou gel¹⁸⁷. Esses materiais, mesmo sendo eficazes, podem ter preços elevados e não serem sustentáveis para a utilização em grande escala em programas de monitoramento de vetores de plasmódios, os quais devem dispor de ferramentas de baixo custo e de fácil uso, levando em consideração o emprego em áreas remotas. Dessa maneira, dispositivos de liberação que utilizem material de baixo custo e de fácil manipulação, podem ser alternativas sustentáveis.

A facilidade de preparação é um aspecto importante a ser considerado para utilização de atraentes sintéticos em campo. Sachês de polietileno de baixa densidade (PBD) são um exemplo de material de fácil preparação e vêm sendo muito utilizados para a liberação prolongada de atraentes para anofelinos^{169,176,188-190}, porém a desvantagem do uso de sachês de PBD é a tendência a vazamentos, o que pode provocar sucessivas substituições durante o tempo de uso, afetando sua eficácia¹⁸⁸. Mukabana, et al.¹⁸⁸ relataram que sachês de PBD, preenchidos com um atraente sintético, precisaram ser trocados a, aproximadamente, cada 10 dias e atraíram um número menor de fêmeas de *An. gambiae s.s.* em relação à outro liberador com matriz têxtil impregnado com o mesmo atraente sintético.

Com materiais têxteis, os compostos ativos são impregnados nas matrizes, sendo feitos com relativa facilidade, exigindo pouca tecnologia e são amplamente utilizados para liberar atraentes sintéticos em armadilhas para capturar anofelinos africanos^{173,188,190,191}. Okumu, et al.¹⁹⁰ desenvolveram um liberador composto por nylon cortado em tiras, as quais são embebidas em cada um dos compostos de determinada formulação atraente. A eficácia em campo das tiras de nylon foi comprovada ao capturar um número superior de *An. gambiae s.l.* em relação aos outros liberadores avaliados, sachês e frascos de vidro abertos. Em outros estudos, esse mesmo liberador de nylon, além da eficácia em atrair anofelinos, se manteve viável por um longo período, de 40 noites¹⁸⁸ até um ano após a impregnação com os cairomônios¹⁹². Desde então, as tiras de nylon vêm sendo amplamente utilizadas em armadilhas para capturar mosquitos^{173,174,188,190,191,193}. Tecidos de poliéster e algodão, também foram avaliados para liberar cairomônios e apresentaram um desempenho igualmente bom ou ainda melhor do que o nylon para monitorar *An. gambiae s.l.*¹⁹¹. No entanto, tais materiais não permitem a liberação controlada dos cairomônios no ambiente, além de possuírem uma curta duração. Embora as tiras de nylon tenham sido capazes de atrair mosquitos por um longo período¹⁹², a sua taxa de liberação também é desconhecida.

Embora as matrizes sólidas sejam eficazes para distribuir odores, devido aos vários materiais que podem ser utilizados, a taxa de liberação dos compostos pode diferir significativamente de uma matriz para outra¹⁸⁵. Os liberadores do tipo reservatório são os mais indicados para liberação controlada, sendo geralmente constituídos por duas partes, um reservatório impermeável e uma membrana de difusão¹⁷⁷. Recentemente, o grupo de pesquisa do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores da Universidade Federal de Minas Gerais (Lintec/UFMG), desenvolveu e patenteou (Depósito de patente BR1020190110783) um sistema de liberação de odores do tipo reservatório, constituído por uma matriz porosa (onde composto ativo é incorporado), um recipiente impermeável (onde a matriz é fixada) e uma membrana polimérica externa que é firmemente conectada ao recipiente, selando-o, a qual regula a distribuição do composto ativo no ambiente. Esse sistema, temporariamente denominado “Membrana Polimérica” (MP) é simples, de baixo custo e fácil de preparar. Portanto, neste capítulo, a MP foi avaliada pela primeira vez em campo para capturar anofelinos, sendo comparada à dois sistemas de liberação amplamente utilizados para capturas vetores, as tiras de nylon e um liberador comercialmente disponível.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da redução de aproximadamente 50% nos casos de malária em todo o mundo no período entre 2000 e 2015¹⁹⁴. Nos últimos três anos, o número de casos de malária vem aumentando e uma proporção significativa dessa transmissão está ocorrendo fora das residências, onde o alcance das principais ferramentas de controle vetorial MILD e BRI não é satisfatório. Além disso, desafios como a crescente resistência a inseticidas nas populações de vetores e o comportamento dos vetores residuais, isto é, que não foram atingidos por essas ferramentas, podem reduzir sua resposta ao controle. Esses desafios, associados ao comportamento humano, como passar muito tempo fora das residências ao entardecer, comprometem a possibilidade de eliminação da malária em muitos cenários.

Um importante problema é a necessidade de novas ferramentas para monitorar e prevenir (quando for possível) essa transmissão persistente, especialmente no peridomicílio. A captura por atração humana ainda se mantém como a técnica mais eficiente de monitoramento vetorial, porém, apesar de sua ampla utilização, é uma técnica difícil de padronizar, pois depende da atratividade inata e da habilidade individual do coletor em capturar os mosquitos. Além disso, tem sido bastante debatida devido a questões éticas, principalmente pela exposição do agente coletor e o risco de contrair patógenos. Por consequência, a realização dessa técnica atualmente se encontra restrita. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos que possam substituir com segurança e ser tão eficientes quanto a atração humana, se faz cada vez mais necessário.

Dispositivos que utilizam odores como isca vêm sendo propostos como uma possível alternativa à atração humana, principalmente para monitorar vetores no peridomicílio. A BGM demonstrou ser um método sensível para monitorar o principal vetor de plasmódios no Brasil, *Ny. darlingi*, porém ainda não foi testada para capturar anofelinos africanos. Desde o seu desenvolvimento, a BGM vem sendo modificada visando o seu aprimoramento e, assim, tentar aumentar a sua eficiência de captura. Contudo, apesar dos excelentes resultados obtidos por Gama, et al.¹²⁸ que demonstraram a equivalência da BGM à atração humana, no estudo subsequente, em uma nova comparação de ambos os métodos, não houve reprodutibilidade dos resultados¹³⁹, evidenciando a necessidade de dar continuidade aos estudos de otimização da armadilha, bem como estudar a sua aplicabilidade como uma ferramenta complementar de controle.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o uso da armadilha BG-Malária no monitoramento de anofelinos e otimizá-la com o uso de atraentes sintéticos e liberadores poliméricos, no Brasil e Tanzânia, visando a potencial substituição da técnica de captura por Atração Humana, bem como testar sua aplicabilidade como ferramenta complementar de controle em um sistema push-pull.

3.2 Específicos

- Comparar a armadilha BG-Malária à outros métodos de amostragem, como a armadilha BG-Sentinel e a captura por atração humana, para capturar fêmeas de *Anopheles* spp. na Tanzânia.
- Comparar armadilhas BG-Malária iscadas com os atraentes Ifakara Blend, Mbita Blend, BG-Lure e CO₂ para capturar *Anopheles* spp. na Tanzânia.
- Comparar armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente Ifakara Blend quando liberado por tiras de nylon, BG-Sachê e BG-Cartucho para capturar *Anopheles* spp. na Tanzânia.
- Comparar o comportamento de voo de fêmeas de *Anopheles arabiensis* ao se aproximarem das armadilhas BG-Sentinel e BG-Malária.
- Avaliar o efeito da altura de instalação da armadilha BG-Malária no comportamento de voo de fêmeas de *Anopheles arabiensis*.
- Avaliar o comportamento de voo de fêmeas de *Anopheles arabiensis* diante da armadilha BG-Malária quando iscada com o atraente Ifakara Blend ou CO₂.
- Avaliar a proteção contra picadas de *Anopheles arabiensis*, após a adição das armadilhas BG-Malária (componente *pull* do sistema *push-pull*).
- Avaliar a proteção contra picadas de *Anopheles arabiensis* após a instalação de faixas de juta impregnadas com transflutrina no beiral das casas (componente *push* do sistema *push-pull*).
- Avaliar a eficácia do sistema *push-pull* completo para proteção contra picadas de *Anopheles arabiensis*.
- Avaliar o efeito da quantidade de armadilhas BG-Malária no sistema *push-pull* para proteção contra picadas de *Anopheles arabiensis*.
- Avaliar o efeito da distância entre a armadilha BG-Malária e a casa contendo faixas de juta impregnadas com transflutrina para proteção contra picadas de *Anopheles arabiensis*.

- Avaliar o efeito da adição da mistura de *Saccharomyces cerevisiae* e melaço de cana como fonte de CO₂, aos atraentes Ifakara Blend e Mbita Blend na armadilha BG-Malária para capturar fêmeas de *Nyssorhincus* spp. no Brasil.
- Comparar armadilhas BG-Malária iscadas com os atraentes Ifakara Blend, Mbita Blend e CO₂ para capturar fêmeas de *Anopheles* spp. no Brasil.
- Comparar armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente Ifakara Blend quando liberado pela Membrana Polimérica, tiras de nylon e BG-Cartucho para capturar *Anopheles* spp. e *Nyssorhincus* spp. no Brasil e na Tanzânia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em áreas endêmicas para a malária na Tanzânia, na cidade de Ifakara, e no Brasil, na cidade de Manaus no Estado do Amazonas, com o apoio dos institutos de pesquisa Ifakara Health Institute (IHI) e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), respectivamente.

4.1.1 Tanzânia e Ifakara Health Institute

A Tanzânia, oficialmente República Unida da Tanzânia, é um país localizado na África subsaariana e possui 945.087 km². Após ser uma colônia alemã e posteriormente colônia britânica, o país conquistou sua independência em 1964. Embora a capital da Tanzânia ser a cidade de Dodoma, onde está localizada a sede oficial do governo e do parlamento, a capital econômica e principal cidade é Dar Es Salaam, a qual foi capital do país até 1996 e permanece sendo o local da maioria das instituições governamentais. Existem mais de 100 idiomas diferentes falados no país, porém o Suahili e o Inglês são as línguas oficiais.

Os aproximadamente 52 milhões de habitantes estão divididos em 26 regiões, das quais a região de Morogoro, sudeste do país, abriga o município de Ifakara, local onde foi realizado o presente estudo. Ifakara está localizada no Vale do Rio Kilombero, a 420 km de Dar Es Salaam, e possui aproximadamente 60.000 habitantes, os quais residem em sua maioria nas zonas rurais do município (Figura 5). O nome Ifakara refere-se a "um lugar onde se vai para morrer", provavelmente devido às altas taxas de mortalidade, por doenças como a malária e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), historicamente vivenciadas nessa área antes do início de assistência à saúde organizada. Atualmente, o município conta com um dos 9 hospitais de referência na Tanzânia, o Saint Francis Referral Hospital, e uma grande instituição de pesquisa, IHI, que assistem as necessidades de saúde prioritárias das comunidades locais¹⁹⁵.

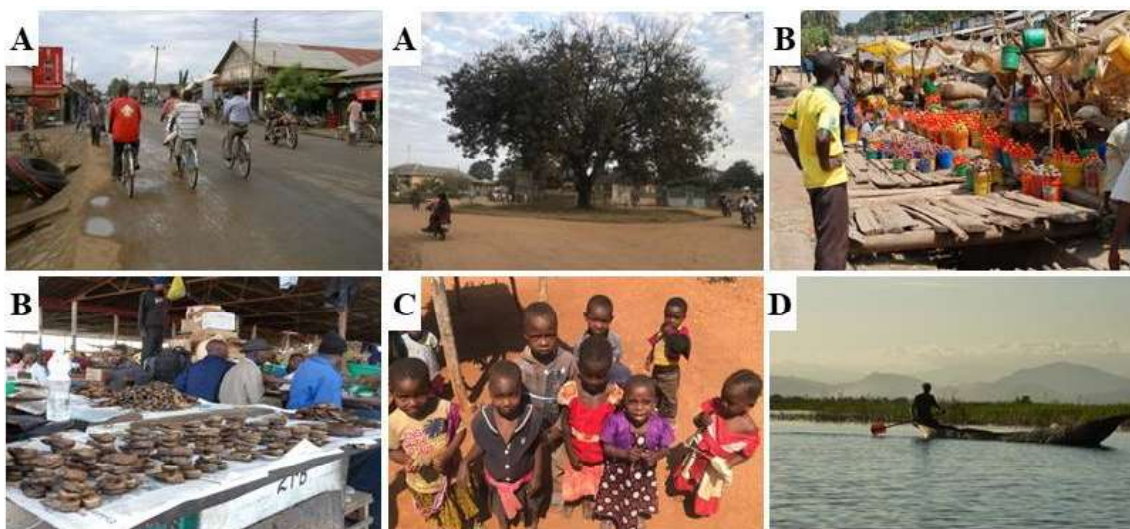


Figura 5. Cidade de Ifakara, região de Morogoro, sudeste da Tanzânia. (A) Ruas no centro da cidade; (B) Mercado Municipal; (C) Crianças habitantes de uma zona rural do município; (D) Pescador no Rio Kilombero, uma das principais atividades econômicas do município. Fonte: Autora e <https://ifakara.org>.

O IHI é reconhecido mundialmente por suas pesquisas sobre malária, porém também realiza pesquisas relacionadas à saúde em várias outras áreas, incluindo HIV/AIDS, tuberculose e diversas doenças tropicais negligenciadas, como esquistossomose, tripanossomíase, oncocercose, filariose, entre outras. Foi fundado em 1956, pelo cientista Rudolf Geigy do Swiss Tropical Institute, com o nome de Swiss Tropical Institute Field Laboratory. Posteriormente, em 1996, foi rebatizado para Ifakara Health Research and Development Centre, que durou até 2008, ano em que o corrente nome foi alterado e o atual escritório sede do instituto, em Dar Es Salaam, foi inaugurado¹⁹⁵.

Além das cidades Dar Es Salaam e Ifakara, o instituto conta ainda com outra filial localizada no município de Bagamoyo, sendo estas últimas dependências os locais que abrigam toda a infraestrutura de pesquisa do instituto, incluindo laboratórios de ponta que realizam estudos sobre vacinas para a malária, testes de medicamentos e resistência a antibióticos, além de possuir instalações para a realização de estudos clínicos de Fase I a III conforme a Boa Prática Clínica (padrão de qualidade científica e ética internacional para o desenho, condução, registro e relato de estudos que envolvam a participação de seres humanos. Além disso, o IHI ainda conta com uma ampla estrutura de áreas de semicampo, com diferentes compartimentos, que juntas somam mais de 6000 m². Essas estruturas foram projetadas para simular o ecossistema natural de mosquitos em comunidades endêmicas para a malária, as quais são usadas para estudos sobre ecologia, monitoramento e controle de vetores¹⁹⁵.

4.1.2 Locais dos experimentos

Os experimentos em semicampo foram conduzidos somente na Tanzânia, em três áreas de semicampo do IHI, as quais possuem paredes de tela resistentes a raios UV e um teto de polietileno. Duas dessas áreas utilizadas medem aproximadamente 200m², sendo que em uma delas foi montado uma estrutura simulando uma vila típica da zona rural de Ifakara, onde haviam duas casas e vários tipos de vegetação simulando o ecossistema local (Figura 6). A terceira área de semicampo consistia em um túnel de 110m de comprimento (2m de largura e 2,5m de altura), no qual também foi construída uma casa.



Figura 6. Estrutura das áreas de semicampo do Ifakara Health Institute, localizado na cidade de Ifakara, região Kilombero, sudeste da Tanzânia. À esquerda, o semicampo de 200m² adaptado para simular uma vila rural de Ifakara e seu ecossistema. À direita, o semicampo em forma de túnel com 110m de comprimento. Fonte: <http://ihi.or.tz>.

Os experimentos em campo foram conduzidos tanto na Tanzânia quanto no Brasil. Na Tanzânia, o estudo foi realizado em três vilas (Minepa, Lupiro e Katindiuka), localizadas na zona rural a aproximadamente 30 km ao sul de Ifakara (08°08'44,2"S 36°40'15,2"L) (Figura 7). Essas áreas são perenemente hiperendêmicas para malária e seus residentes podem receber aproximadamente 352 picadas infectantes por ano^{75,196}. A precipitação média é de 1500 mm por ano, enquanto que a temperatura média é de 26,3°C¹⁹⁷.

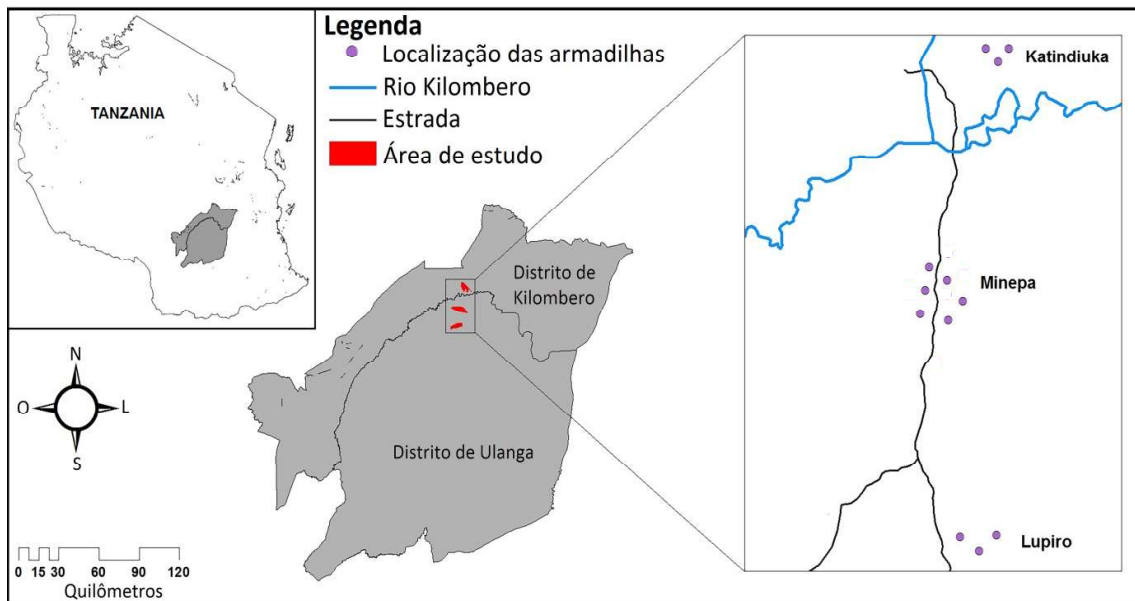


Figura 7. Mapa da área onde os experimentos em campo foram realizados, mostrando as vilas rurais nos distritos de Ulanga e Kilombero, na cidade de Ifakara, sudeste da Tanzânia.

No Brasil, a malária é hipoendêmica a mesoendêmica, cujo padrão de transmissão é instável, com flutuações sazonais ao longo do ano^{198,199}. A área selecionada para o estudo foi o Ramal do Brasileirinho, cujo número de casos de malária registrados em 2018 foi 445²⁰⁰. Essa área está localizada na área periurbana de Manaus, a 18 km do INPA (03°00'54,5"S 59°50'11"O) (Figura 8), e a média anual de temperatura e precipitação é de 27,4°C e 2145 mm, respectivamente.

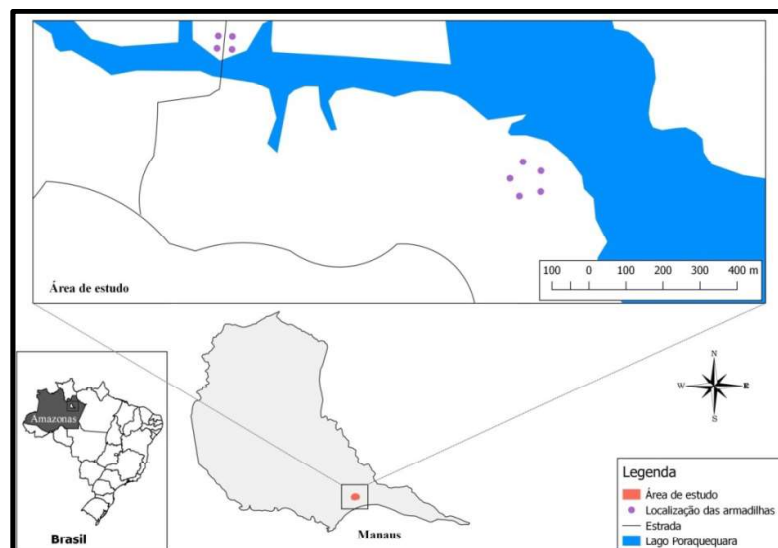


Figura 8. Mapa da área onde os experimentos em campo foram realizados, mostrando a localização das armadilhas no Ramal do Brasileirinho na zona periurbana, na cidade de Manaus – AM, região Norte do Brasil.

4.2 Mosquitos

Nos experimentos realizados em semicampo, foram utilizados mosquitos da espécie *An. arabiensis* criados em laboratório. A colônia teve início com mosquitos provenientes da vila rural Lupiro, distrito de Ulanga, Tanzânia, e tem sido mantida no insetário do IHI desde 2009. As larvas foram mantidas sob condições padronizadas para insetários ($29\pm 1^\circ\text{C}$, UR $80\pm 5\%$ e fotoperíodo 12:12h) e alimentadas com ração para peixe Tetramin[®]. Os adultos foram mantidos em uma sala separada (27°C e UR 70–90%), dentro de gaiolas de criação (30 x 30 x 30 cm) contendo solução de sacarose a 10% para a alimentação. Foram utilizadas nos experimentos fêmeas de *An. arabiensis* com idade entre 5 e 8 dias que não receberam alimentação sanguínea e em jejum de sacarose por 6h antes dos testes.

4.3 Métodos utilizados para capturar mosquitos

Em todos os experimentos, tanto em semicampo quanto em campo, a BGM foi utilizada e a BGS foi incluída nos experimentos onde se comparou os métodos para capturar anofelinos africanos. Ainda sobre esses últimos experimentos mencionados, a captura por atração humana (HLC) também foi adicionada quando o experimento de comparação de métodos foi realizado em campo, na Tanzânia. A HLC foi realizada por dois técnicos, do sexo masculino, que possuíam experiência em capturar anofelinos. Os técnicos dividiram o tempo de captura, tendo o primeiro voluntário iniciado a captura às 18:00h e finalizado às 00:00h e o segundo realizado a captura entre 00:00h e 06:00h, com o período de captura sendo trocado diariamente entre ambos. Todos os voluntários foram informados sobre a pesquisa e assinaram um termo de consentimento conforme descrito na seção “Considerações éticas”.

4.4 Atraentes utilizados nas armadilhas

Quatro atraentes foram utilizados no estudo e estão listados abaixo:

(i) Ifakara Blend (IB)¹⁷⁴: Amônia (2,5%), Ácido láctico (85%), Ácido propiônico (0,1%), Ácido butanóico (1%), Ácido pentanóico (0,01%), Ácido 3-methylbutanóico (0,001%), Ácido heptanóico (0,01%), Ácido octanóico (0,01%) e Ácido tetradecanóico (0,01%).

(ii) Mbita Blend (MB5)¹⁷³: Amônia (2,5%), Ácido láctico (85%), Ácido tetradecanóico (0,00025%) e 3-methyl-1-butanol (0,000001%);

(iii) BG-Lure[®] (BioGents HmGb, Regensburg, Germany): Amônia, Ácido láctico e Ácido capríco, em concentrações não informadas pelo fabricante.

(iv) CO₂²⁰¹: Água (2L), melão de cana-de-açúcar (500mL) e *Saccharomyces cerevisiae* (35g).

Os atraentes IB e CO₂ foram utilizados em todos os experimentos, enquanto os atraentes BG-Lure e MB5 foram utilizados somente nos experimentos em que todos os atraentes foram comparados.

4.5 Sistemas de liberação de odores utilizados nas armadilhas

Cinco sistemas de liberação de odores foram utilizados no estudo e estão listados abaixo (Figura 9):

(i) *Membrana Polimérica (MP)* (Depósito de patente BR1020190110783 – Anexo 1): O sistema consiste em uma matriz porosa com os constituintes do atraente incorporados, um recipiente impermeável para alocação da matriz e uma membrana polimérica conectada ao recipiente, selando-o. O atraente foi incorporado à MP, de modo a constituir 10% do seu peso final;

(ii) *BG-Cartucho*: Microcápsulas embebidas nas substâncias constituintes do atraente revestidas por um cartucho de polipropileno, fornecido pela Biogents Company;

(iii) *BG-Sachê*: Microcápsulas embebidas nas substâncias constituintes do atraente revestidas por um envelope produzido com papel grau cirúrgico e uma fina membrana de policloreto de vinila, fornecido pela Biogents Company;

(iv) *Tiras de nylon*: Tiras de nylon (90% poliamida e 10% elastano) de 26,5cm x 1cm embebidas individualmente (e ao final agregadas por uma de suas extremidades) nas substâncias constituintes do atraente. Para os experimentos em que foi utilizada, as tiras de nylon foram recém-preparadas, estando novas para cada experimento.

(v) *Sistema para liberar CO₂*: O CO₂ produzido pela fermentação do melaço de cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi liberado a partir de um container de plástico de 5L, equipado com um tubo plástico de 60 cm medindo 0,5 cm de diâmetro²⁰¹.

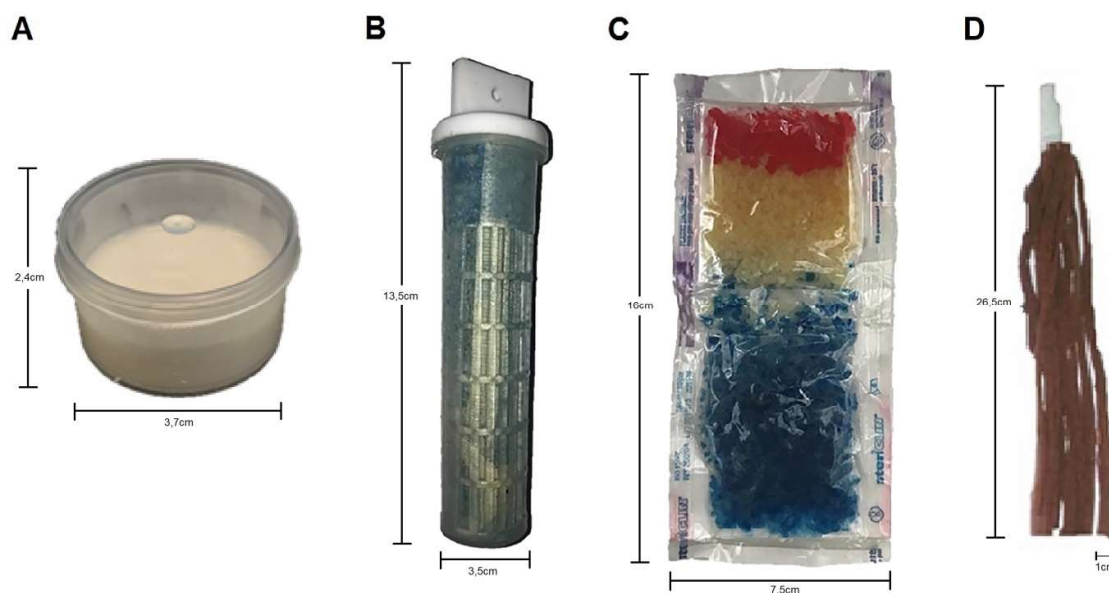


Figura 9. Sistemas de liberação utilizados nas armadilhas BG-Malária e BG-Sentinel. (A) Membrana Polimérica desenvolvida pelo Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores; (B) BG-Cartucho: microcápsulas revestidas por um cartucho de polipropileno fornecido pela Biogents Company; (C) BG-Sachê: microcápsulas revestidas por um envelope de papel grau cirúrgico e policloreto de vinila fornecido pela Biogents Company; (D) Tiras de nylon: tiras de nylon constituídas por 90% de poliamida e 10% de elastano (Fonte: Adaptado de Okumu, et al. ¹⁹⁰).

4.6 Equipamento de gravação e software para análise das imagens

Para avaliar o comportamento de voo dos mosquitos quando próximos à BGM, foi utilizado um equipamento de gravação fornecido pela Noldus Information Technology. Os experimentos foram conduzidos em um estúdio construído dentro do laboratório para estudos de vetores da malária (Vectosphere), no IHI, medindo 4m² e revestido com tela de fibra de vidro escura nas paredes e no chão para reduzir o reflexo nas câmeras com infravermelho. Três câmeras monocromáticas de alta resolução (Basler acA1300 - 60gmNIR) com sensores complementares de semicondutores de óxido de metal (CMOS), juntamente com três iluminadores infravermelho (Raytec RM25-120 Raymax 25 com feixe de luz de 120-180°) com espectro de comprimento de onda de 850 nm, foram montados em tripés dentro do estúdio apontando em diferentes ângulos para capturar várias imagens. As câmeras foram conectadas a um computador na sala de controle, anexa ao estúdio de gravação. Os mosquitos foram filmados através do uso do software Noldus Media Recorder (MR) 2.5, que produziu imagens sincronizadas das três câmeras no formato MPEG-4.

4.7 Componentes do sistema *push-pull*: Transflutrina (*push*) e a BGM (*pull*)

O componente *pull* do sistema *push-pull* avaliado foi a armadilha BGM iscada com CO₂, enquanto que o componente *push* foi um repelente espacial, o piretróide Transflutrina. A transflutrina foi liberada através de faixas confeccionadas com uma camada tripla de tecido juta em dois tamanhos para serem encaixadas nas partes frontal/fundos (15cm X 2,5m) e nas laterais das casas (15cm x 1m; um par para cada lado da casa) em espaços abertos de 20cm de largura localizados no beiral (Figura 10).



Figura 10. Instalação das faixas de juta impregnadas com o piretróide Transflutrina nas casas da área de semicampo do Ifakara Health Institute, Tanzânia. Adaptado de Mmbando, et al. ¹⁰².

Para impregnar as faixas, soluções de 0,02% de transflutrina foram utilizadas por terem fornecido uma proteção de aproximadamente 70% em experimentos conduzidos por Mmbando, et al. ¹⁰². Para fazer a solução de 0,02%, foram misturados 0,2 mL de transflutrina com 99,8 ml do detergente líquido, e em seguida adicionado 900 ml de água, para obtenção de um volume total de 1l de solução. Após a lavagem com detergente líquido neutro para remoção de impurezas e secagem, as faixas foram embebidas separadamente na solução de transflutrina e em seguida secadas em local sombreado livre de radiação solar direta. Dada a pureza (97%) e densidade (1,51g/cm³) do ingrediente ativo, e o método de tratamento utilizado, a quantidade final de transflutrina por área de superfície nas faixas foi de 0,25 g/m².

4.8 Experimentos

4.8.1 Comparação entre diferentes métodos de captura para monitoramento de vetores africanos da malária

Para comparar os métodos de captura para monitoramento de anofelinos africanos, foram realizados experimentos em semicampo e campo em Ifakara. Em semicampo, na área

de 200m², um experimento de escolha binária com duração de 12h (18:00 as 06:00h) (Figura 3), foi conduzido para comparar a BGM contra a BGS para capturar fêmeas de *An. arabiensis*. Ambas as armadilhas foram iscadas com o atraente IB, suplementado com CO₂, e liberado pelo BG-Cartucho. O experimento teve 10 repetições e 200 fêmeas foram liberadas por repetição no centro da câmara de testes, totalizando 2000 fêmeas ao final dos testes. As armadilhas foram instaladas em lados opostos da câmara de testes (Figura 11), tendo sua posição invertida a cada noite para evitar qualquer viés relacionado ao local de instalação das armadilhas.

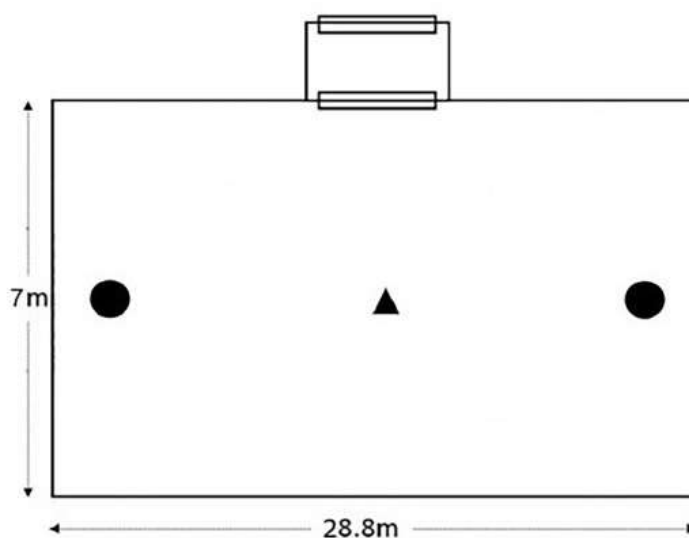


Figura 11. Diagrama esquemático da posição das armadilhas e pontos de liberação dos mosquitos na área de semicampo. Os círculos representam as posições das armadilhas e o triângulo o ponto de liberação dos mosquitos. Os tratamentos testados foram reposicionados diariamente.

Para comparar os métodos de captura de mosquitos em campo, além das duas armadilhas testadas, a captura por HLC foi adicionada ao experimento, tendo sido realizada somente no ambiente peridomiciliar. Foi realizado um quadrado latino 3 x 3 com duração de 12h (18:00 as 06:00h), replicado quatro vezes, totalizando 12 noites de experimento. Em uma das vilas, Minepa, o experimento foi repetido seis vezes, totalizando 72 amostras por método, enquanto nas demais, Lupiro e Katindiuka, o experimento foi realizado apenas uma vez (12 noites), dessa forma, o experimento foi realizado durante um período total de 96 noites.

4.8.2 Avaliação do efeito da adição de CO₂ aos atraentes IB e MB5

Uma comparação em campo foi realizada no Ramal Brasileirinho, em Manaus, para analisar o efeito da adição de CO₂ aos atraentes sintéticos IB e MB5. O experimento teve

duração de 12h (18:00 as 06:00h) e quatro armadilhas BG-Malária foram iscadas com os atraentes avaliados, associados ou não ao CO₂ e uma quinta foi utilizada sem atraente (controle). Portanto, os cinco tratamentos comparados nesse experimento foram **(i)** IB; **(ii)** MB5; **(iii)** IB + CO₂; **(iv)** MB5 + CO₂; e **(v)** controle. A posição dos tratamentos foi invertida diariamente para que cada tratamento passasse por todos os pontos ao final de cinco dias, completando assim uma nova réplica do experimento. As armadilhas foram limpas com álcool 70% e secadas em temperatura ambiente antes de serem reutilizadas. Foi realizado um quadrado latino 5 x 5 com quatro réplicas, totalizando 20 noites. Os atraentes foram liberados pelo BG-Cartucho fornecido pela Biogents Company.

4.8.3 Comparação entre os diferentes atraentes testados na armadilha BG-Malária

Uma avaliação comparativa foi conduzida para analisar os diferentes atraentes e identificar o mais efetivo para ser usado na armadilha BGM na captura de *Anopheles* spp. As armadilhas BGM foram iscadas com os atraentes suplementados com CO₂ e uma BGM sem atraente foi utilizada como controle. Além disso, uma configuração extra, onde o CO₂ era a única isca, também foi adicionada ao experimento. O experimento teve duração de 12h (18:00 as 06:00h) e foi realizado em Ifakara, semicampo e campo, e em Manaus, apenas campo, sendo a quantidade de tratamentos adaptada de acordo com o local, conforme demonstrado na tabela 1. O delineamento experimental foi o quadrado latino e a posição dos tratamentos foi invertida diariamente, de modo que após o final de cada rodada, cada tratamento tivesse passado por todos os pontos pelo menos uma vez. As armadilhas foram limpas com álcool 70% e secadas em temperatura ambiente antes de serem reutilizadas.

Tabela 1. Tratamentos utilizados nos experimentos de avaliação dos atraentes para serem utilizados na armadilha BG-Malária, realizados em Manaus (Brasil) e Ifakara (Tanzânia).

Local do experimento	Ambiente	Tratamentos	Delineamento experimental	Duração
Ifakara, Tanzânia - Ifakara Health Institute (câmara de 200m ²) - Vila Minepa	Semicampo Campo	Controle	Quadrado latino 5 x 5	20 noites
		IB + CO ₂		
		MB5 + CO ₂		
		BG-Lure +		
		CO ₂		
Manaus, Brasil - Ramal Brasileirinho	Campo	Controle	Quadrado latino 4 x 4	16 noites
		IB + CO ₂		
		MB5 + CO ₂		
		CO ₂		

Controle = Armadilha sem isca; IB + CO₂ = Armadilha iscada com o atraente sintético Ifakara Blend + CO₂; MB5 + CO₂ = Armadilha iscada com o atraente sintético Mbita Blend + CO₂; BG-Lure + CO₂ = Armadilha iscada com o atraente sintético BG-Lure (fornecido pela Biogents Company) + CO₂; CO₂ = Armadilha iscada somente com CO₂. O CO₂ utilizado no experimento foi originado a partir da fermentação do melão de cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para o experimento em semicampo, a cada noite um total de 600 fêmeas de *An. arabiensis* foi liberado na câmara de testes. Nesse experimento, dois pontos de liberação de mosquitos foram utilizados, como mostrado na figura 12, com 300 mosquitos liberados por ponto.

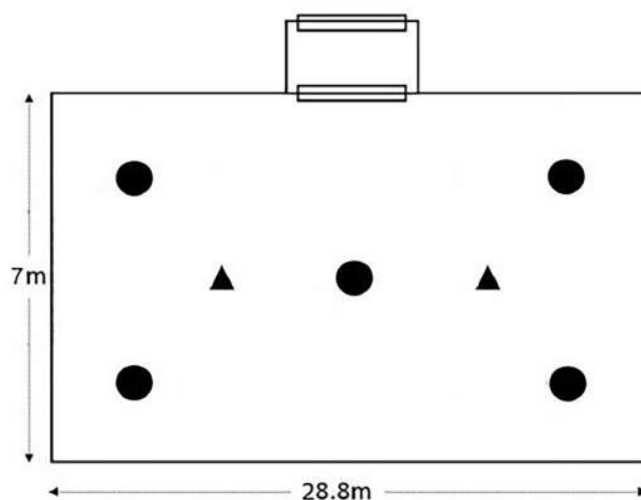


Figura 12. Diagrama esquemático da posição das armadilhas e pontos de liberação dos mosquitos na área de semicampo. Os círculos representam as posições das armadilhas e o triângulo o ponto de liberação dos mosquitos. Os tratamentos testados foram reposicionados diariamente.

4.8.4 Comparação entre os diferentes sistemas de liberação de atraentes testados na armadilha BG-Malária

O atraente IB utilizando diferentes sistemas de liberação e a influência desses em seu potencial atrativo na armadilha BGM, foi avaliado. Primeiramente, o experimento foi realizado em Ifakara, tanto semicampo quanto em campo, onde foram avaliados os seguintes tratamentos: (i) Tiras de nylon; (ii) BG-Sachê (iii) BG-Cartridge; e (iv) Controle (BGM sem isca). O experimento teve duração de 12h (18:00 as 06:00h) e as armadilhas iscadas com o IB em diferentes liberadores, suplementadas CO₂, foram colocadas em quatro posições. O delineamento experimental foi o quadrado latino 4 x 4, com cinco réplicas, totalizando 20 noites de experimento. O experimento em campo foi realizado na Vila Minepa e em semicampo no IHI, na na câmara de testes de 200m². A localização das armadilhas no

semicampo está ilustrada na figura 13, bem como os dois pontos de liberação dos mosquitos. Foram liberadas 200 fêmeas de *An. arabiensis* por ponto, totalizando 400 mosquitos utilizados por noite.

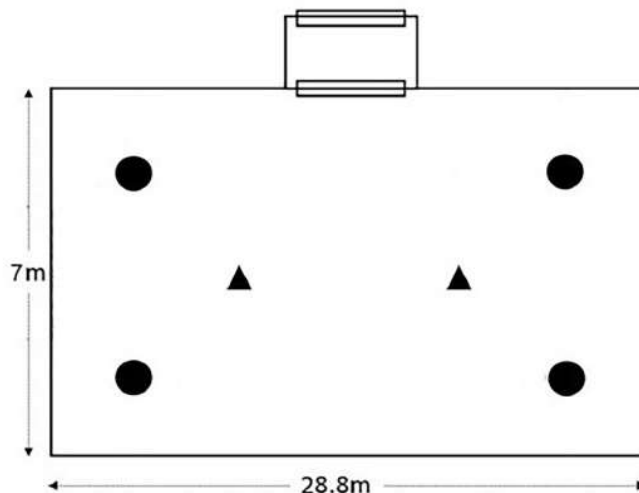


Figura 13. Diagrama da posição das armadilhas e pontos de liberação dos mosquitos na área de semicampo. Os círculos representam as posições das armadilhas e os triângulos os pontos de liberação dos mosquitos. Os tratamentos testados foram reposicionados diariamente.

Posteriormente, um novo experimento foi realizado utilizando os mesmos parâmetros do experimento anterior, incluindo a duração, o delineamento experimental, os locais do experimento e a quantidade de mosquitos no semicampo. No entanto, os tratamentos avaliados foram modificados e o Ramal Brasileirinho, em Manaus, foi adicionado para que o experimento também fosse realizado no Brasil, com anofelinos sulamericanos. Portanto, esse experimento foi realizado, em semicampo e campo, na Tanzânia e, em campo, no Brasil e os tratamentos avaliados foram **(i)** MP; **(ii)** BG-Cartucho; **(iii)** Tiras de nylon; e **(iv)** uma BGM sem atraente, como controle.

4.8.5 Avaliação do comportamento de voo de Anopheles arabiensis perante à armadilha BG-Malária

Para analisar o comportamento de fêmeas de *An. arabiensis* diante da BGM, o estudo foi dividido em três experimentos e a configuração básica do processo de gravação é mostrada na Figura 14. As três câmeras foram posicionadas de tal forma que **(i)** uma câmera focou a entrada da armadilha (51cm x 36cm para a BGS e 40cm x 36cm para a BGM) (aqui mencionado como “entrada”), **(ii)** outra focou a lateral da armadilha (36cm x 36cm) (“lateral”) e **(iii)** a terceira focou o fundo da armadilha (36cm de diâmetro) (“base”). A

câmera focada na base foi utilizada somente nos experimentos 2 e 3, nos quais somente a BGM foi utilizada, a qual foi pendurada no centro do estúdio utilizando um suporte de madeira. Dessa forma, a entrada, a lateral e a base constituíram a arena de filmagem. As câmeras capturaram até 68 quadros por segundo.

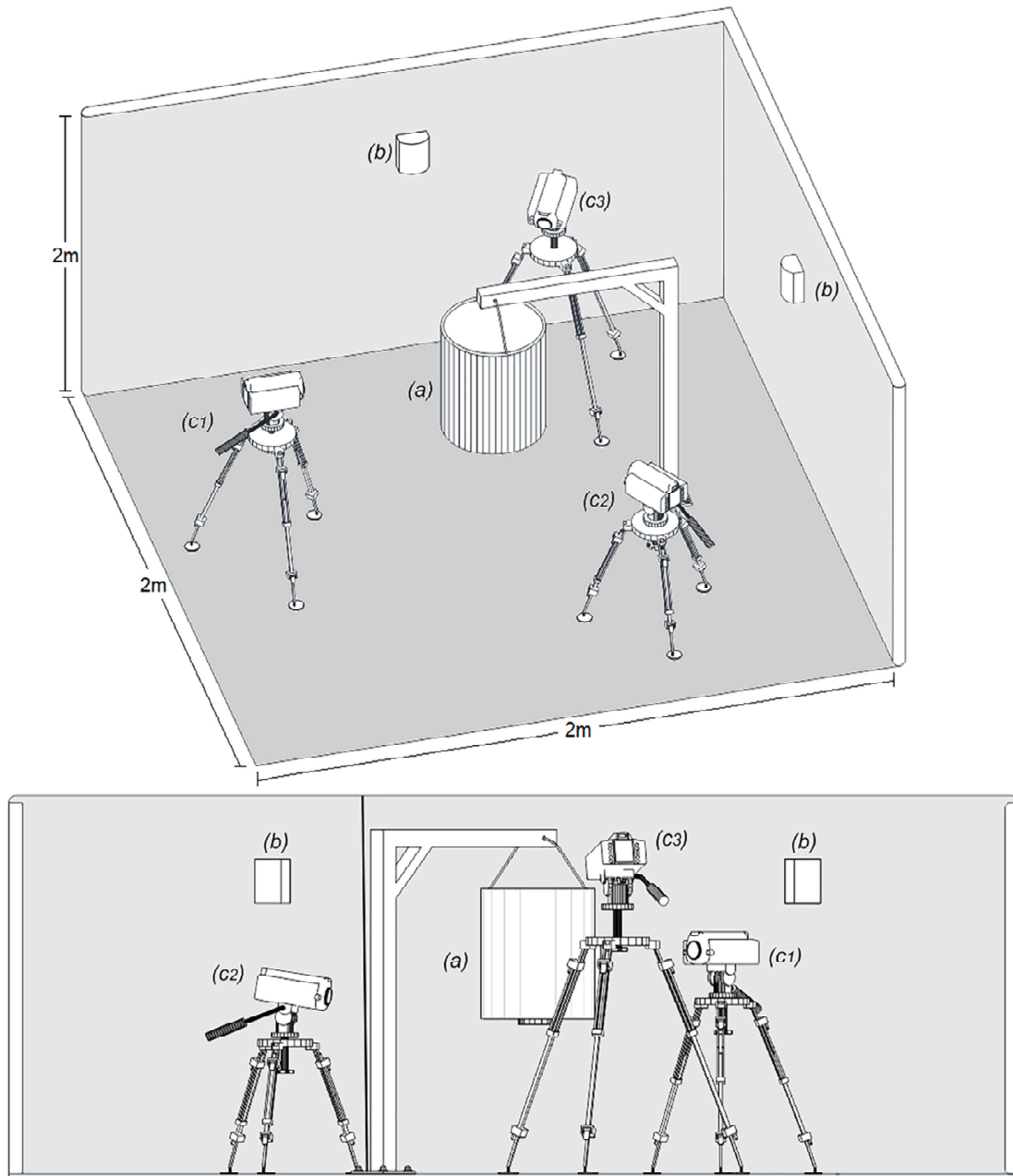


Figura 14. Diagrama esquemático da montagem dos experimentos no estúdio de filmagem. A armadilha BG-Malária (a) foi instalada no centro do estúdio e cercada pelos iluminadores infravermelho (b) e as três câmeras (c1-3). As câmeras foram posicionadas para focarem a lateral (c1), a entrada (c2) e a base da armadilha (c3).

Para todos os experimentos, 50 mosquitos foram liberados no estúdio e gravados por 30 minutos voando ao redor das armadilhas. Antes do início da gravação, 10 minutos foram reservados para a ambientação dos mosquitos, após a sua liberação. Todos os experimentos foram realizados no período noturno e repetidos quatro vezes, sendo que, antes de cada repetição, o estúdio foi vistoriado para remover os mosquitos dos testes anteriores com o auxílio de uma raquete elétrica.

*a) Experimento 1: Avaliação do comportamento de voo do **An. arabiensis** em direção às armadilhas BGS e BGM*

Individualmente, as armadilhas BGM e BGS foram instaladas no centro do estúdio de gravação e o comportamento dos mosquitos ao redor das armadilhas foi gravado. As armadilhas foram iscadas com o atrente sintético IB, suplementado com CO₂, e liberado BG-Cartucho fornecido pela Biogents Company. Como a BGS é instalada no chão, não foi possível filmar a base da armadilha, portanto, para esse experimento foram registradas apenas imagens para a entrada e a lateral de ambas as armadilhas.

*b) Experimento 2: Avaliação do impacto da altura de instalação da armadilha BG-Malária no comportamento de voo do **An. arabiensis***

A BGM foi posicionada no centro do estúdio, tendo como tratamentos nesse experimento a altura de instalação a 20cm, 40cm e 80cm acima do solo. Em todos os testes, a armadilha foi iscada com o atrente IB, suplementado com CO₂, e liberado BG-Cartucho fornecido pela Biogents Company.

*c) Experimento 3: Avaliação do comportamentos de voo do **An. arabiensis** em torno da armadilha BG-Malária iscada com diferentes atraentes*

Nesse experimento, a BGM foi avaliada com três configurações: quando iscada com (i) o atraente IB, suplementado com CO₂, e liberado BG-Cartucho fornecido pela Biogents Company; (ii) somente com CO₂; e (iii) armadilha sem atraente (controle). Todos os tratamentos foram avaliados separadamente e em dias diferentes, de modo a minimizar uma possível contaminação entre os tratamentos.

*4.8.6 Avaliação do sistema push-pull para proteção contra picadas de **Anopheles arabiensis***

Para avaliar o sistema *push-pull*, o estudo foi dividido em cinco experimentos, que foram realizados em semicampo em Ifakara, Tanzânia. Em todos os experimentos, 500

fêmeas de *An. arabiensis* foram liberadas diariamente, sendo que na câmara de 200m² os mosquitos foram liberados no centro da câmara equidistante das duas casas, enquanto que nos testes realizados no túnel de 110m os mosquitos foram divididos em três gaiolas (contendo 167 mosquitos em cada) e liberados de três pontos diferentes de modo a garantir que os mosquitos fossem distribuídos igualmente no túnel. Os experimentos foram conduzidos diariamente entre 18:30h e 06:30h durante um período de 9 meses, contando com os intervalos de 5 dias para limpeza do semicampo entre os experimentos. Durante os experimentos, entre 18:30h e 22h, os mosquitos foram capturados no peridomicílio por atração humana realizada por técnicos experientes, um técnico por casa. Após as 22h, os técnicos entraram nas casas onde permaneceram até as 06:30h, dormindo sob um mosquiteiro, enquanto as capturas intradomiciliares eram realizadas por armadilhas do tipo CDC, instaladas ao lado dos mosquiteiros. Esse design experimental foi realizado para simular o comportamento natural das pessoas nas áreas periurbanas e rurais, as quais permanecem no ambiente peridomiciliar durante o período crepuscular até aproximadamente 22h, momento em que entram nas casas para dormir²⁰².

Antes da realização de cada experimento para avaliar os componentes *push* e *pull* ou ambos combinados (*push-pull*), foram realizadas avaliações da configuração do semicampo no comportamento de forrageio dos mosquitos, antes da adição dos componentes do sistema, configuração esta que foi utilizada como controle. Portanto, os experimentos realizados para avaliação do sistema *push-pull* foram assim divididos:

a) Experimento 1: Avaliação do componente pull para proteção contra picadas de *An. arabiensis*

O experimento foi conduzido por 15 noites consecutivas, iniciando com cinco noites de avaliação do ambiente controle, seguidas de dez noites de experimento com a adição da BGM no semicampo. As armadilhas foram instaladas no peridomicílio, posicionadas no lado direito de cada casa (uma por casa), a uma distância de 5m. Os mosquitos foram capturados conforme descrito acima e a proteção contra picadas nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar foram comparados com o controle.

b) Experimento 2: Avaliação do componente push para proteção contra picadas de *An. arabiensis*

Assim como no experimento anterior, este experimento também teve duração de 15 noites, sendo 5 noites de controle e as demais noites com a adição das faixas de juta impregnadas com tranflutrina no beiral das casas. Os mosquitos foram capturados conforme

descrito anteriormente e a proteção contra picadas nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar foram comparados com o controle.

*c) Experimento 3: Avaliação do efeito combinado da BGM e da faixa de juta impregnada com transflutrina para proteção contra picadas de **An. arabiensis***

Nesse experimento, o efeito combinado da BGM e das faixas de juta impregnadas com transflutrina, ou seja, o sistema *push-pull* completo, foi avaliado no semicampo durante 15 noites. Inicialmente, em 5 noites o ambiente controle (sem armadilha e repelente) foi avaliado, seguido de 10 noites de experimentos com a adição do *push-pull*. Os mosquitos foram capturados conforme descrito anteriormente e a proteção contra picadas nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar foram comparados com o controle.

*d) Experimento 4: Avaliação do efeito da quantidade de BGMs no sistema push-pull para proteção contra picadas de **Anopheles arabiensis***

A eficácia do sistema *push-pull* foi avaliada em relação à quantidade de BGMs utilizada. Para isso, as faixas de juta impregnadas com transflutrina foram fixadas no beiral das casas e diferentes números de armadilhas foram adicionados para testar as seguintes combinações do sistema; **(i)** faixas com transflutrina e uma armadilha instalada no centro do semicampo (0,5 armadilha/casa); **(ii)** faixas com transflutrina e duas armadilhas instaladas a 5m do lado direito de cada casa (1 armadilha/casa) e **(iii)** faixas com transflutrina e quatro armadilhas instaladas a 5m de ambos os lados de cada casa (2 armadilhas/casa). Cada combinação foi testada por 15 noites, começando com cinco noites de controle seguidas por dez noites de avaliação dos tratamentos, totalizando 45 noites. Os mosquitos foram capturados conforme descrito anteriormente e a proteção contra picadas nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar foram comparados com o controle.

*e) Experimento 5: Avaliação do efeito da distância entre a BGM e as faixas de juta impregnadas com transflutrina para proteção contra picadas de **An. arabiensis***

Esse experimento foi realizado na área de semicampo em forma de túnel por um total de 30 noites (12 noites de controle e 6 noites para cada tratamento, para avaliar o sistema *push-pull* quando as armadilhas estão instaladas em diferentes distâncias em relação à casa contendo as faixas de juta impregnadas com transflutrina. Portanto, o sistema *push-pull* foi avaliado quando as armadilhas estavam instaladas a **(i)** 5m; **(ii)** 15m; e **(iii)** 30m de distância da casa. Os mosquitos foram capturados conforme descrito anteriormente e a proteção contra picadas nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar foram comparados com o controle.

4.9 Processamento dos mosquitos coletados: triagem, identificação e exame da paridade

Para os experimentos realizados na Tanzânia, ao final de cada dia de experimento, todos os exemplares coletados foram encaminhados à VectorSphere no IHI para identificação (mosquitos capturados em campo) e contagem. A classificação morfológica foi utilizada para agrupar os mosquitos em *An. gambiae s.l.*, *An. funestus s.l.*, outros *Anopheles* spp. ou Culicíneos.

As espécies de anofelinos pertencentes aos complexos de espécies crípticas *An. gambiae s.l.* e *An. funestus*, capturadas em campo, foram mantidas em um microtubo de 1,5 mL com sílica gel para análise por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação das espécies. As amostras foram enviadas ao laboratório responsável por realizar as análises moleculares para o Ifakara Health Institute. Além disso, aproximadamente 10% das fêmeas de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* capturadas foram dissecadas seguindo o protocolo recomendado pela OMS¹¹³ proposto por Detinova¹¹⁴, para determinar o estado de paridade. A técnica consiste basicamente na remoção dos ovários com o auxílio de um microestilete e observação da presença de traquéolas distendidas em microscópio (10x).

No Brasil, os espécimes capturados em campo foram identificados no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, através de classificação morfológica seguindo as chaves propostas por Consoli e Oliveira (1994) e Forattini (2002).

4.10 Análise dos dados

Para os experimentos de avaliação em campo e semicampo da armadilha BGM, a análise dos dados foi realizada utilizando o software R versão 3.3.2²⁰³. No caso dos experimentos em campo, o número total de mosquitos de cada táxon capturado foi comparado de acordo com os tratamentos. Em todos os experimentos, Modelos Lineares Generalizados (MLGs) foram utilizados para estimar o número de mosquitos capturados como uma função dos diferentes tipos de armadilhas, atraentes ou liberadores. Para explicar a sobredispersão, o número de mosquitos capturados foram modelados seguindo uma distribuição binomial negativa com função de ligação log usando o pacote *lme4*²⁰⁴. Para cada experimento, os fatores fixos foram os tratamentos e para verificar o efeito da variação dos fatores ambientais (temperatura e vento) durante o período de estudo, a data do experimento, o número de replicação e as posições das armadilhas foram tratadas como fatores aleatórios para cada análise nos respectivos experimentos. O Risco Relativo (RR) e o Intervalo de Confiança 95% (IC) foram utilizados para estimar a influência do fator fixo. Na análise da paridade, MLG

com probabilidade binomial para os dados de proporção foi utilizado com o pacote *lme4*. As proporções da paridade dos mosquitos, por método de captura, foram tratadas como fatores fixos, enquanto que data e localização foram tratados como fatores aleatórios. As estimativas foram consideradas estatisticamente diferentes se $p < 0,05$. Adicionalmente, uma comparação de pares foi realizada utilizando o teste post-hoc Diferença Realmente Significativa de Tukey (HSD de Tukey) para avaliar a diferença entre os grupos individuais.

No experimento de avaliação do comportamento dos mosquitos através de vídeoanálise, primeiramente, os vídeos dos experimentos foram analisados com o software Ethovision XT 11.5 (Noldus Information Technology), para obter os mapas de calor e a trajetória individual dos mosquitos. O software Ethovision XT 11.5 foi capaz de traçar o trajeto de no máximo 16 mosquitos por vez por arena, porém não consegue manter a identidade durante todo o período registrado. Posteriormente, os dados numéricos brutos foram exportados para o software R, para análises posteriores. Os parâmetros utilizados para avaliar o comportamento de voo dos mosquitos em resposta as armadilhas foram: **(1)** velocidade do voo, **(2)** tempo gasto em cada arena e **(3)** frequência de visita nas arenas. MLGs foram utilizados, onde a frequência de visita dos mosquitos foi modelada utilizando-se Poisson com a armadilha como fator fixo e as repetições como fator aleatório. O tempo gasto e a velocidade dos mosquitos foram modelados usando a distribuição Gamma com a armadilha como fator fixo e as repetições como fator aleatório.

Para analisar os dados dos experimentos com o sistema *push-pull*, também utilizou-se o software R. Em todos os experimentos, o número de mosquitos capturados foram modelados por MLGs, seguindo uma distribuição binomial negativa com função de ligação log usando o pacote *lme4*²⁰⁴. Os fatores fixos foram a presença dos componentes *push*, *pull* ou ambos combinados, o número de armadilhas, a distância entre as armadilhas e as casas e o ambiente das capturas (intradomicílio/peridomicílio). Para verificar o efeito da variação dos fatores ambientais (temperatura e vento) durante o período de estudo a data do experimento e a identificação das casas foram tratadas como fatores aleatórios para cada análise nos respectivos experimentos. O RR e o IC 95% foram utilizados para estimar a influência de cada fator fixo. As estimativas foram consideradas estatisticamente diferentes se $p < 0,05$. A proteção contra picadas dos mosquitos foi calculada através da quantidade de mosquitos capturados em cada experimento, em relação aos seus respectivos ambientes controle, utilizando a seguinte equação:

$$Proteção (\%) = \left(\frac{Controle - Tratamento}{Controle} \right) \times 100$$

4.11 Considerações éticas

Todos os voluntários que realizaram a captura por atração em humanos foram informados do objetivo do estudo, benefícios e riscos envolvidos na pesquisa. A participação nos experimentos só foi realizada após os voluntários assinarem um termo de consentimento. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Ifakara Health Institute (IHI/IRB/No: 34-2014) e, também, pela Coordenação do Conselho de Pesquisa Médica do Instituto Nacional de Pesquisa Médica da Tanzânia (Certificado N°. NIMR/HQ/R.8a/Vol.IX/1903).

5. RESULTADOS

Os resultados encontram-se descritos em artigos publicados em revistas indexadas e dados não publicados, os quais serão apresentados conforme abaixo:

Batista EPA, Ngowo HS, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Okumu FO, et al. Semi-field assessment of the BG-Malária trap for monitoring the African malária vector, *Anopheles arabiensis*. *PloS One*. 2017; 12(10):e0186696.

Batista EPA, Ngowo HS, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Siria DJ, et al. Field evaluation of the BG-Malária trap for monitoring malária vectors in rural Tanzanian villages. *PloS One*. 2018; 13(10):e0205358.

Batista EPA, Mapua SA, Ngowo HS, Matowo NS, Eiras AE and Okumu FO. Flight behaviour of host-seeking *Anopheles arabiensis* towards BG-Malária trap. *PLoS One*. 2019;14(7):e0220563. doi: 10.1371/journal.pone.0220563.

Arnold S. Mmbando, Elis P. A. Batista, Masoud Kilalangongono, Marceline F. Finda, Emmanuel P. Mwanga, Emmanuel W. Kaindoa, et al. Evaluation of a push–pull system consisting of transfluthrin-treated eave ribbons and odour-baited traps for control of indoor and outdoor-biting malária vectors. *Malaria Journal*. 2019; 18(1): 87.

DADOS NÃO PUBLICADOS:

Avaliação de atraentes sintéticos para utilização na armadilha BG-Malária para capturar anofelinos no Brasil.

Avaliação da Membrana Polimérica como sistema de liberação controlada do atraente sintético Ifakara Blend para utilização na armadilha BG-Malária.

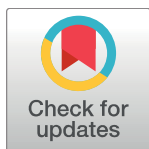
RESEARCH ARTICLE

Semi-field assessment of the BG-Malaria trap for monitoring the African malaria vector, *Anopheles arabiensis*

Elis P. A. Batista^{1,2*}, Halfan S. Ngowo², Mercy Opiyo², Gasper K. Shubis², Felician C. Meza², Fredros O. Okumu^{2,3,4}, Alvaro E. Eiras¹

1 Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Environmental Health and Ecological Sciences Department, Ifakara Health Institute, Ifakara, Tanzania, **3** School of Public Health, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Parktown, Republic of South Africa, **4** Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

* ebatista@ihi.or.tz



OPEN ACCESS

Citation: Batista EPA, Ngowo HS, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Okumu FO, et al. (2017) Semi-field assessment of the BG-Malaria trap for monitoring the African malaria vector, *Anopheles arabiensis*. PLoS ONE 12(10): e0186696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696>

Editor: Clive Shiff, Johns Hopkins University, UNITED STATES

Received: June 28, 2017

Accepted: October 5, 2017

Published: October 18, 2017

Copyright: © 2017 Batista et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: EPAB was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Grant 88881.133584/2016-01) and AEE funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI) (Grant 310205/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant PPM-00502-15).

Abstract

Odour-baited technologies are increasingly considered for effective monitoring of mosquito populations and for the evaluation of vector control interventions. The BG-Malaria trap (BGM), which is an upside-down variant of the widely used BG-Sentinel trap (BGS), has been demonstrated to be effective to sample the Brazilian malaria vector, *Anopheles darlingi*. We evaluated the BGM as an improved method for sampling the African malaria vectors, *Anopheles arabiensis*. Experiments were conducted inside a large semi-field cage to compare trapping efficiencies of BGM and BGS traps, both baited with the synthetic attractant, Ifakara blend, supplemented with CO₂. We then compared BGMs baited with either of four synthetic mosquito lures, Ifakara blend, Mbita blend, BG-lure or CO₂, and an unbaited BGM. Lastly, we compared BGMs baited with the Ifakara blend dispensed via either nylon strips, BG cartridges (attractant-infused microcapsules encased in cylindrical plastic cartridge) or BG sachets (attractant-infused microcapsules encased in plastic sachets). All tests were conducted between 6P.M. and 7A.M., with 200–600 laboratory-reared *An. arabiensis* released nightly in the test chamber. The median number of *An. arabiensis* caught by the BGM per night was 83, IQR:(73.5–97.75), demonstrating clear superiority over BGS (median catch = 32.5 (25.25–37.5)). Compared to unbaited controls, BGMs baited with Mbita blend caught most mosquitoes (45 (29.5–70.25)), followed by BGMs baited with CO₂ (42.5 (27.5–64)), Ifakara blend (31 (9.25–41.25)) and BG lure (16 (4–22)). BGM caught 51 (29.5–72.25) mosquitoes/night, when the attractants were dispensed using BG-Cartridges, compared to BG-Sachet (29.5 (24.75–40.5)), and nylon strips (27 (19.25–38.25)), in all cases being significantly superior to unbaited controls (p < 000.1). The findings demonstrate potential of the BGM as a sampling tool for African malaria vectors over the standard BGS trap. Its efficacy can be optimized by selecting appropriate odour baits and odour-dispensing systems.

FOO was funded by a Visiting Researcher Fellowship from CNPq/MCTI, (Grant 42070/2013-2) and a Wellcome Trust Intermediate Research Fellowship (Grant WT102350/Z/13/Z). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Large-scale implementation of the two front-line vector control interventions against African malaria vectors, i.e., long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS), have led to major reductions in malaria cases contributing just over three quarters of all gains since 2000 [1]. Despite these gains, there appears to be persistent transmission, a significant proportion of which may be occurring outdoors and is not targeted effectively by LLINs and IRS [2, 3]. Other challenges include the growing physiological insecticide resistance in vector populations [4–6] and behavioural responses of the residual malaria vectors, which may also lower their responsiveness to control [7–9]. These challenges, combined with poor user-compliance and human behaviours, such as spending most of the time outside dwellings in the evenings, heavily compromise the likelihood of malaria elimination in many settings [10–12].

An important and closely related problem is the need for new tools to monitor this persistent transmission, especially in areas where a significant proportion of biting occurs outdoors [7, 13, 14], but also in areas where specific interventions need to be matched to certain vector species behaviours and responsiveness. Odour-baited devices have been proposed as potential complementary tools to sample malaria mosquitoes outdoors [15–21], but also to disrupt transmission [22]. Examples of odour-baited traps or human-baited traps previously used for malaria mosquitoes include, the Suna Trap [23], Odour-Baited Mosquito Entry Trap [20, 24], Ifakara-Tent Trap [20], Ifakara Odour-baited stations [25], the MMX trap [26, 27], the Mosquito Landing Box [18] and BG-Sentinel Trap [28].

The BG-Malaria trap (BGM) [29, 30] is a modified version of the original BG-Sentinel (BGS) trap created by Biogents Company, Germany. The BGM trap was adapted to collect *Anopheles* species. BGM has already been demonstrated as a sensitive method for monitoring Brazilian malaria vectors [29, 30], but it has not previously been tested for African malaria vectors. The main difference between the two traps is the airflow orientation. The BGM is installed upside down, 40 cm above the ground, making it a simple adaptation of BGS. This adaptation was considerably more effective than other commercial traps tested, including the original BGS and CDC-Light Traps, and performed almost as well as human landing catches (HLC) in Brazilian field tests [29].

In the initial trials, the bait used in BGM trap was CO₂ obtained from dry ice [29, 30]. However, to improve trap efficacy, other baits such as synthetic human odours should also be explored. The synthetic odour blend developed at Ifakara Health Institute (i.e. Ifakara Blend) is one candidate lure, already demonstrated in long-range village tests to be more attractive to malaria and non-malaria mosquitoes, than real humans [31]. There are several other synthetic attractant variants, potentially equal or perhaps more effective.

Other than the actual mosquito attractants, studies also have demonstrated that performance of these attractants is influenced by the medium from which they are dispensed [32–34]. For example, nylon strips have been used effectively for the release of attractants for host-seeking malaria mosquitoes [31, 33–38]. Other examples of odour dispensing materials have included low density polyethylene (LDPE) sachets [39–41] and glass vials [31, 33]. These have shown that an appropriate selection of the dispensing medium to liberate the odorants should be considered at least as important as the actual attractants or traps.

The main aim of this study was to evaluate the efficiency of an odour-baited BGM trap for sampling host-seeking laboratory-reared *An. arabiensis*. We examined the efficacy of the BGM relative to the original BGS trap and compared four different attractant types for baiting the BGM. We also tested three different odour-dispensing methods used in the BGM.

Materials and methods

Study site

The work was conducted at Ifakara Health Institute, in a semi-field system facility [42] located at Ifakara branch, in Kilombero district, southeastern Tanzania. The semi-field system consists of three-chambered large screened-enclosures, measuring 28.8m by 21m, with walls made of UV-resistant shade netting, and a polyethylene roof mounted on a raised concrete platform [42]. We used two chambers of this facility, each measuring 28.8m by 7m.

Mosquitoes

Laboratory-reared *An. arabiensis* mosquitoes were used. The colony (with mosquitoes originally from Lupiro village, Ulanga district, Tanzania) has been maintained in the laboratory at Ifakara Health Institute since 2009. The mosquito larvae are reared under standard insectary conditions ($29\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ RH and 12:12h photoperiod) and fed with Tetramin[®] fish food. Adult mosquitoes were kept in a separate room, where temperatures were maintained at an average temperature of $\sim 27^\circ\text{C}$ and relative humidity at 70–90%. Female and male adults were housed together in a 30 x 30 x 30 cm mating cage and 10% sucrose solution was placed in the cage as a food source. To propagate the colony, the adult female mosquitoes were fed also on human blood (by way of volunteer arm-feeding from five to ten mins every two days). *An. arabiensis* females aged three to eight days that had not previously taken any blood meals were used for this study. Before beginning of the experiments each night, mosquitoes were selected early and starved by withdrawing the glucose solution, 6 h in advance, to encourage host-seeking behaviour.

BG-Sentinel trap (BGS) and BG-Malaria trap (BGM)

The BGS (BioGents HmGb, Regensburg, Germany) has a cylindrical shape, 35cm in diameter and 40cm in height. Centered inside the trap is a black collecting tube (12cm in diameter x 30cm in length), with a bag for collecting mosquitoes. An electric fan (12V, 14 cm diameter, powered by a 12 V battery) produces a cycle downward flow of air that exits through a gauze cover on the top of the trap and draws in mosquitoes that approach the collecting tube [28]. The interior of the trap can be fitted with different types of mosquito attractants, from which the odours exit through the gauze cover to lure mosquitoes [28].

The BGM is an upside down variant of the BGS [29]. The BGM is hanged upside down, 40cm above the ground, with an electrical fan (12V, 14cm diameter, powered by a 12V battery), which produces an upward suction to capture the mosquitoes that approach the trap. The two traps, BGS and BGM, are illustrated in Fig 1.

Synthetic attractants

Three synthetic mosquito attractants were used: (i) the BG-Lure (BioGents HmGb, Regensburg, Germany), which consists of a mixture of ammonia, L-lactic acid, and caproic acid, in undeclared proprietary concentrations; (ii) the Mbita-5 lure (MB5), which consists of ammonia (2.5%), lactic acid (85%), tetradecanoic acid (0.00025%) and 3-methyl-1-butanol (0.000001%) [38]; (iii) the Ifakara blend (IB), which consists of a mixture of ammonia (2.5%), L-lactic acid (85%), propionic acid (0.1%), butanoic acid (1%), pentanoic acid (0.01%), 3-methylbutanoic acid (0.001%), heptanoic acid (0.01%), octanoic acid (0.01%) and tetradecanoic acid (0.01%) [31]. The IB was used in all the experiments in this work, unlike the BG-Lure and MB5, which were used only in the second experiment.

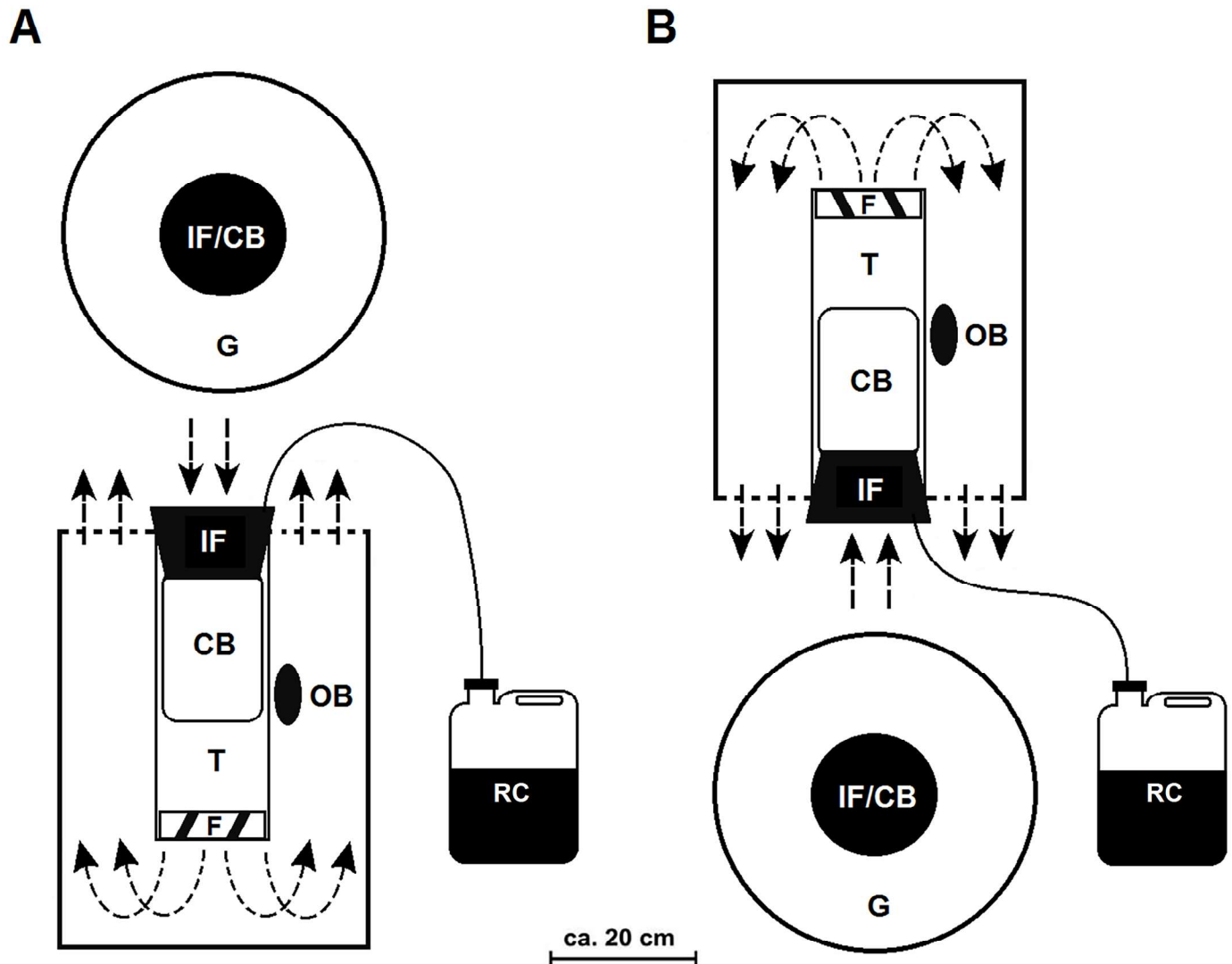


Fig 1. Illustration of design and functionality of: (A) BG-Sentinel and (B) BG-Malaria. IF = Intake funnel; CB = Catch Bag; F = Fan; G = Gauze Cover; T = Tube; RC = Recipient of CO₂; OB = Odour Bait. Arrows indicate the direction of the airflow. Adapted from Kröckel *et al.*, (2006) and Gama *et al.*, (2013).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696.g001>

Attractant dispensing systems

To dispense the synthetic attractants in all the experiments, microcapsules incased in a plastic cartridge (here referred to as BG-Cartridge) supplied by Biogents Company was used. For the experiment where odour-dispensing systems were tested, two others odour-release devices were added. The first was nylon strips, initially tested for dispensing odours attractive to *An. gambiae* in Tanzania [33]. The strips are small pieces of nylon, each measuring 26.5 x 1.0 cm, and infused with different attractant chemicals that make up the attractant blend. To make up the IB, nine of these strips are batched together (each strip carrying a different blend constituent) and then suspended inside the candidate mosquito trap. The second dispensing system added was the BG-Sachet (also supplied by Biogents Company), which consisted of microcapsules of the IB odorant constituents encased inside a thin plastic sachet. The individual dispensing methods are illustrated in Fig 2.

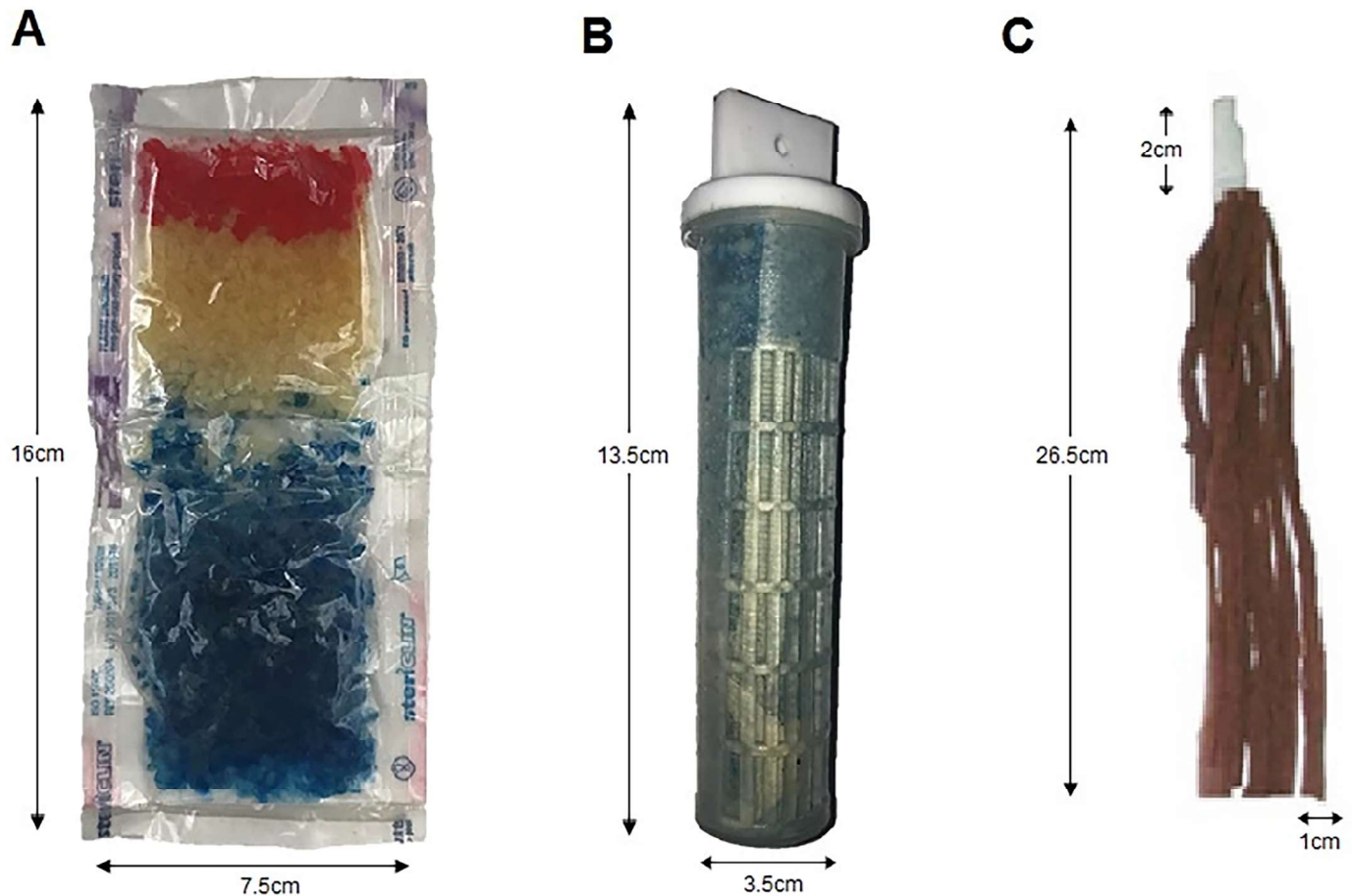


Fig 2. Devices used for dispensing mosquito attractants. Panels A and B show attractants infused inside microcapsules supplied by Biogents Company encased in a plastic sachet (BG-Sachet) and plastic cartridge (BG-Cartridge), respectively. Panel C shows a batch of nylon strips, each soaked in solution of a different constituent of the synthetic attractant [33].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696.g002>

Study procedures

The study consisted of three experiments, conducted nightly between 06.00 P.M. and 07.00 A.M.

Experiment 1. A binary choice experiment (Fig 3A) was conducted to compare BGM against BGS for catching host-seeking *An. arabiensis* mosquitoes. The traps were baited with the synthetic human odour developed at Ifakara Health Institute [31], supplemented with CO₂ gas obtained from yeast-molasses fermentation. Each night, the BGM or BGS were placed at opposite ends of the semi-field testing chamber. This experiment was replicated 10 times, each time releasing 200 adult female *An. arabiensis* mosquitoes at the center of the test chamber (Fig 3A). Each night the trap locations were interchanged to annul any position-related biases. The traps were both powered by 12V rechargeable batteries. The experiment was left to run overnight. The traps were emptied each morning, and all mosquitoes caught in each trap counted and recorded.

Experiment 2. A comparative evaluation was conducted to compare different candidate lures and identify the most effective one for use with the BGM trap for capturing host-seeking *An. arabiensis*. A 5 x 5 Latin square experiment with four replicates was carried out. Four BGM traps were baited with either of the four candidate lures (Fig 3B), and a fifth BGM was

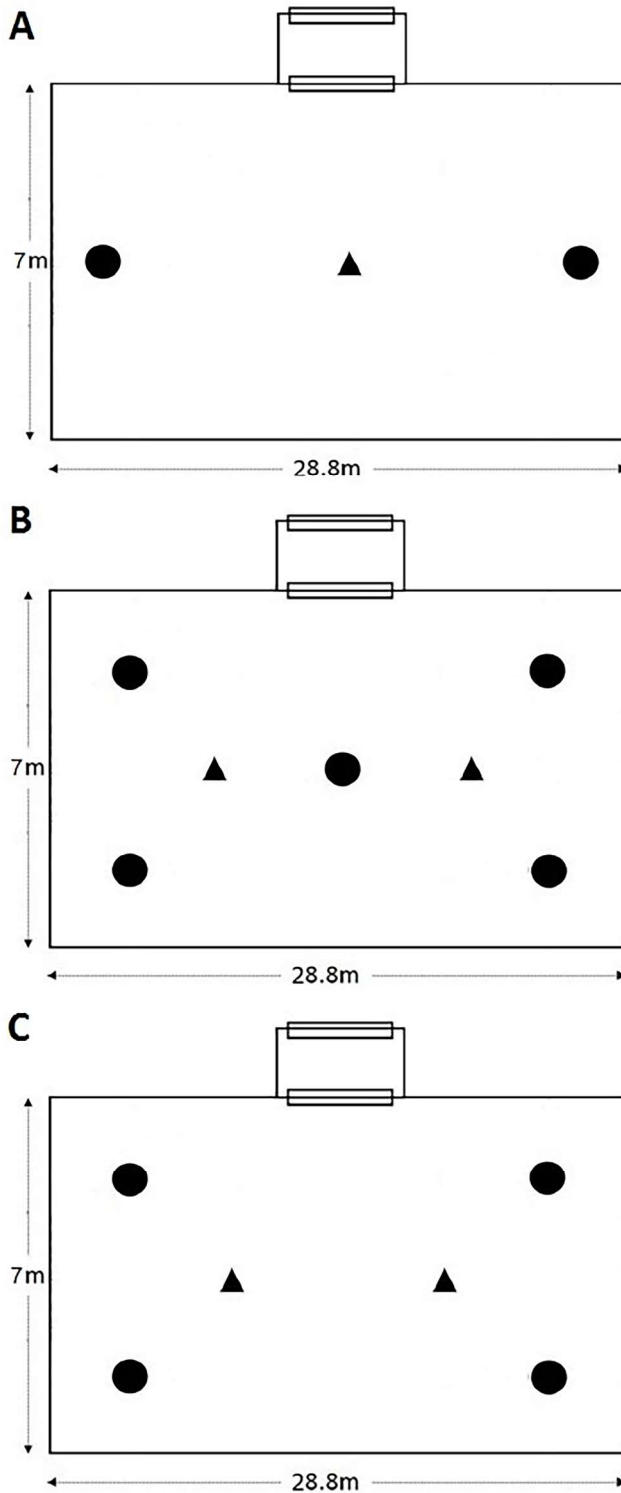


Fig 3. Schematic diagram of the trap positions and mosquito release points within the semi-field system. Set ups for experiments 1, 2 and 3, are shown in figure panels A, B and C, respectively. Trap positions are shown in circles, and mosquito release points in triangles. In all experiments, the treatment being tested was rotated between the test locations nightly.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696.g003>

un-baited. In many field and laboratory studies, synthetic mosquito attractants are commonly augmented with CO₂, to activate the mosquitoes and synergize attractive effects of the lures. We maintained this practice but also had a separate configuration where CO₂ was the only bait, to improve comparison of the lures and separate effects of the CO₂. The five different treatments compared in this experiment were (i) Ifakara blend + CO₂ (referred to simply as IB); (ii) BG-Lure[®] + CO₂; (iii) Mbita-5 Blend + CO₂ (referred to as MB5); (iv) CO₂ alone; and (v) a control consisting of non-baited BGM trap. The IB, MB5 and BG-Lure were dispensed using BG-Cartridges supplied by Biogents Company. The CO₂ was obtained from a mix of 2L water with 500g molasses plus 35g yeast, delivered from a 5L plastic container, through a 60 cm long plastic tubing measuring 0.5 cm in diameter [43].

For each night's experiment, 600 host-seeking female *An. arabiensis* mosquitoes were released in the semi-field chamber. In this experiment, we used two different release points as illustrated in Fig 3B, with 300 mosquitoes released from each point. The locations of the baits were rotated nightly such that after five nights of experimentation, each bait had been to each location at least once. The experiments ran the entire night, and the traps were emptied in the morning, after which number of mosquitoes collected in each trap was recorded for each treatment. The traps were then thoroughly cleaned using a solution of 70% alcohol and dried outdoors before they could be re-used. The experiment was replicated four times over a 20 nights experimental period.

Experiment 3. In the third experiment, we aimed to assess whether the attractiveness of the Ifakara Blend [31] would be affected by the medium from which it is released when used in the BGM supplemented with CO₂ from yeast-molasses fermentation. The dispensing devices tested are shown in Fig 2 and were as follows: (i) Nylon strips [33]; (ii) BG-Sachet (iii) BG-Cartridge; and (iv) control (no baited trap). The nylon strips were freshly prepared for this experiment, while both the sachets and cartridges were provided by the manufacturer, Biogents Company.

The dispensing devices were rotated in four positions during four nights in a 4 x 4 Latin square design, such that after a complete set, each dispensing method had been to each of the four selected locations at least once. The locations of the traps are illustrated in Fig 3C. We marked and fixed the individual trap locations, but locations of the lures were rotated nightly in a random fashion. The experiment was replicated 5 times, over a 20 nights experimental period. Each night, a total of 400 host-seeking *An. arabiensis* mosquitoes were released from two different points in the semi-field test chamber (200 mosquitoes per release point). The number of mosquitoes collected in each trap was recorded each morning.

Data analysis

The analysis was done using R software version 3.3.2 [44]. In all experiments, Generalized Linear Mixed Effects Statistical Models (GLMMs) were used to estimate the number of mosquitoes captured as a function of the different trap types, dispensing devices or lures. To account for the over-dispersion, number of mosquitoes captured (i.e., the mosquito count data) were modeled following a negative binomial distribution with log link function [45]. In the first experiment the main effects were trap type. In the second experiment (testing the effect of different lures on the number of mosquito captured), the main effect was type of lure. In the last experiment (testing the effect of different odour dispensing mechanism), the main effect was type of dispensing devices. To account for the variation in temperatures, winds and any other confounding factors during the study period, the experiment date, replication number and trap locations were treated as random factors for each analysis in respective experiments. Relative risks (RR), and 95% Confidence Intervals (CI) were used to estimate the strength of

influence of each main factor. The estimates were considered statistically significant different if $p < 0.05$. Additionally, pairwise comparison tests were done using Tukey's honest significance difference post-hoc test (Tukey's HSD) to assess differences between individual groups.

Ethical considerations

A written and signed informed consent was obtained from the volunteers working in the mosquito-rearing facility, and arm-feeding of mosquitoes in the insectary was done only by volunteering adult males. This study was approved by both Ifakara Health Institute IRB (IHI/IRB/No: 34–2014) and the Medical Research Coordinating Council at the Tanzania National Institute of Medical Research (Certificate No. NIMR/HQ/R.8a/Vol.IX/1903).

Results

Experiment 1: Test to compare BG Malaria and BG Sentinel traps

Of the 2000 mosquitoes released in the semi-field system chambers throughout the study period, 60.8% were recaptured by the traps. In this experiment, the BGM trap was tested against the BGS trap in a binary choice assay and both traps baited with IB and CO₂. The median nightly catches are shown in Fig 4. The BGM trap was the more effective trap in capturing mosquitoes [RR = 2.76, 95%CI: (1.95–3.89), $p < 0.001$] as compared to BGS trap. There was no effect of location on the overall mosquito catches between chambers. Location was not found to have any significant impact on the number of mosquito collected per trap ($p = 0.773$).

Experiment 2: Test to compare the different mosquito attractants

A total of 15000 mosquitoes were used in this experiment, for which 20.8% of the total were re-captured in the traps. The number of mosquitoes caught was influenced significantly by type of attractant used ($p < 0.001$; DF = 4). While traps baited with MB5, IB and CO₂ alone caught statistically similar numbers of mosquitoes, these were all significantly higher than the number caught in traps baited with the BG-Lure ($p < 0.001$) or the unbaited traps ($p < 0.001$). The median numbers of mosquitoes caught in traps baited by different lures is shown in Fig 5.

As compared to the un-baited BGM, traps baited with MB5 caught the highest number of mosquitoes [RR = 10.50, 95%CI: (5.80–18.99), $p < 0.001$], followed by traps baited with CO₂ [RR = 8.70, 95%CI: (4.81–15.75), $p < 0.001$], IB [RR = 6.34, 95%CI: (3.48–11.58), $p < 0.001$], and BG-Lure [RR = 3.36, 95%CI: (1.84–8.38), $p < 0.001$]. Pair-wise comparison test using Tukey's HSD showed that, there is significant difference between CO₂ and BG-Lure ($z = 0.29$, $p < 0.05$), MB5 and BG-Lure ($z = 0.29$, $p < 0.001$) while the rest of the pairs were not significantly different from one another (Fig 6A).

Experiment 3: Test to compare different odour-dispensing methods

A total of 8000 mosquitoes were used in this experiment, of which 29.9% of the total were re-captured in the traps. The effect of the odour-dispensing mechanism was assessed using BGM trap baited with Ifakara lure dispensed from nylon strips, BG cartridge and BG sachets. Results of this experiment showed significantly higher mosquito catches when using any of the three dispensers, than the control ($p < 0.001$). The nightly median mosquito catches and the inter-quartile ranges are shown in Fig 7. The Tukey's pair-wise comparison showed no significant difference between nylon strips and BG-Sachet ($z = 0.15$, $p = 0.906$), but a slight difference between BG-Sachet and BG-Cartridge ($z = 0.15$, $p = 0.027$) (Fig 6B). The model results shows that of the lure dispensers tested, BG-Cartridge attracted the most mosquitoes [RR = 96.03

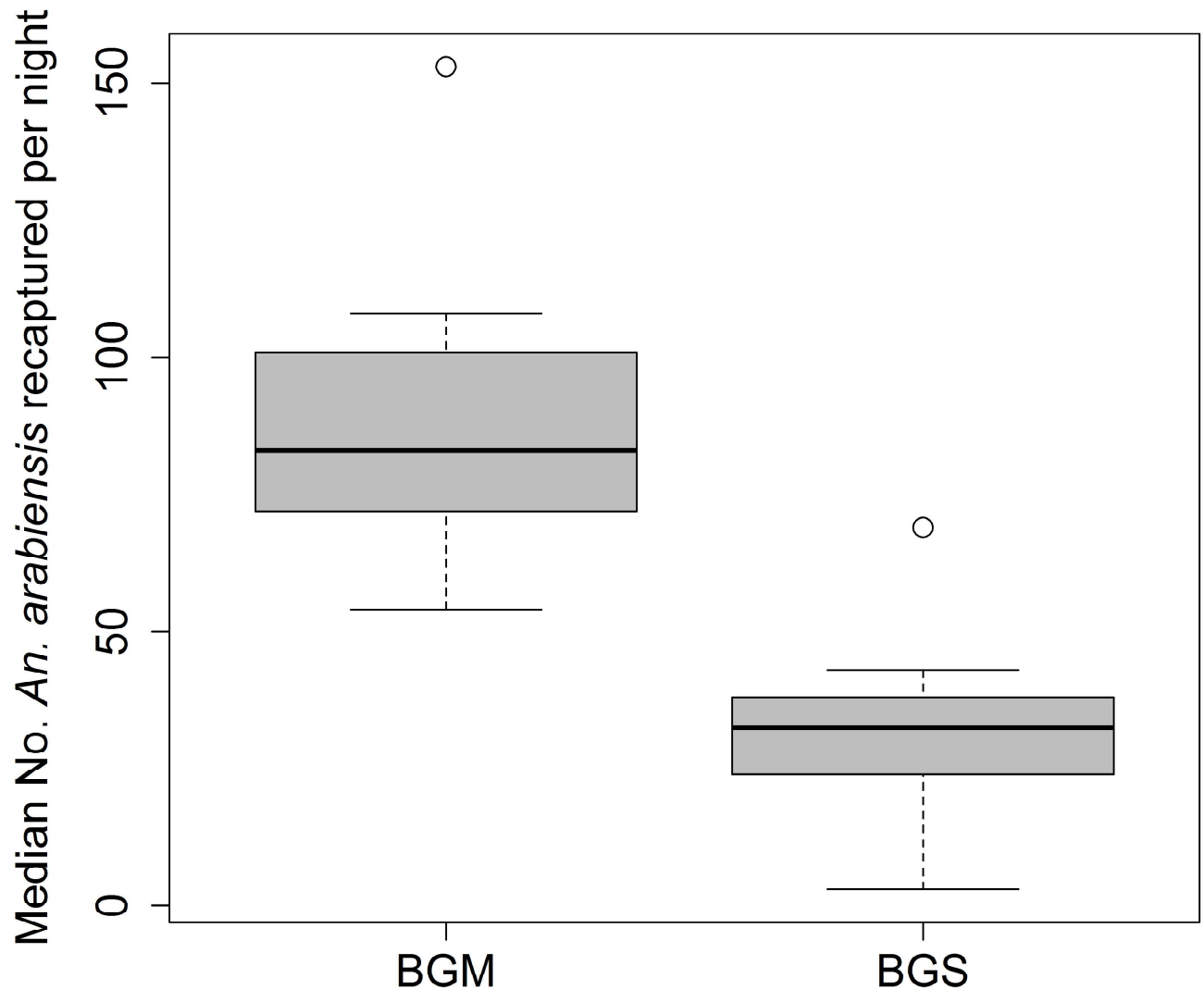


Fig 4. Distribution and median number of *Anopheles arabiensis* recaptured per night using different trapping methods in the semi-field system. BGM = BG-Malaria trap; BGS = BG-Sentinel trap.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696.g004>

(49.79–185.20), $p < 0.001$], followed by BG-Sachet [RR = 63.57 (32.92–122.76), $p < 0.001$] and Nylon strips [RR = 57.46 (29.71–111.11), $p < 0.001$] compared to the control.

Discussion

The search for effective mosquito sampling tools remains a key priority for vector control practitioners and researchers. While the most appropriate trap may be different from place to place, and from vector species to species, it is important that all traps for large-scale field use are robust, easy to use, low-cost and have minimal need for replacement parts. The chemical nature of the attractants and attractant dispensing systems for use in these traps should also have similar attributes, but also be scalable, safe for human handling and readily available. This study describes the effectiveness of BG-Malaria (BGM) trap, an adaptation of BG-Sentinel (BGS) trap, as a sampling device for host-seeking *An. arabiensis* mosquitoes under semi-field conditions. Twice as many mosquitoes were caught by the BGM trap than by the BGS trap,

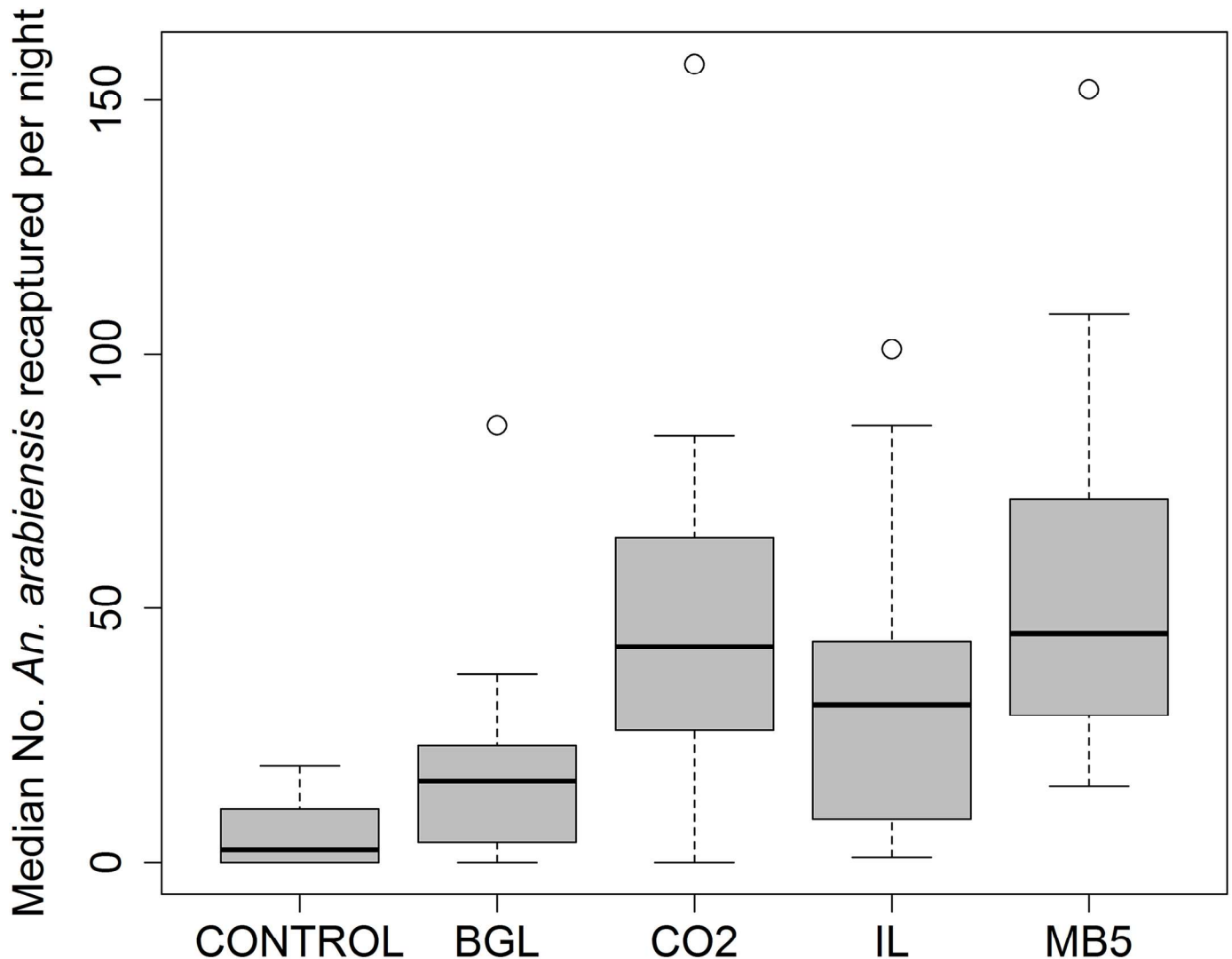


Fig 5. Distribution and median number of *Anopheles arabiensis* recaptured per night by BGM traps baited with different lures in the semi-field system. CO₂ = Trap baited with only CO₂; MB5 = Trap baited with Mbita lure + CO₂; IB = Trap baited with Ifakara blend + CO₂; BG = Trap baited with BG-Lure + CO₂; Control = unbaited trap.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696.g005>

which has previously been demonstrated as an effective trap for different mosquito species, including the malaria vector, *An. gambiae s.s* [46]. The BGS trap was originally designed for sampling *Aedes aegypti* mosquitoes [28], but because of its ease of use and demonstrated efficacy in a variety of field settings, it has become a good candidate for sampling malaria vectors [16, 46, 47] and is now widely used in research and surveillance settings.

In a field study conducted in Brazil [29], the BGM trap was demonstrated as being highly effective and nearly comparable to human landing catches, the most representative sampling strategy for human-biting mosquitoes [48]. By changing the BGS trap orientation and installing it upside down, 40 cm above the ground, it was observed that collections of the Brazilian malaria vector, *An. darlingi* were extremely increased [29]. In this current study, our results have demonstrated that similar modifications also work for laboratory-reared African malaria vector, *An. arabiensis*.

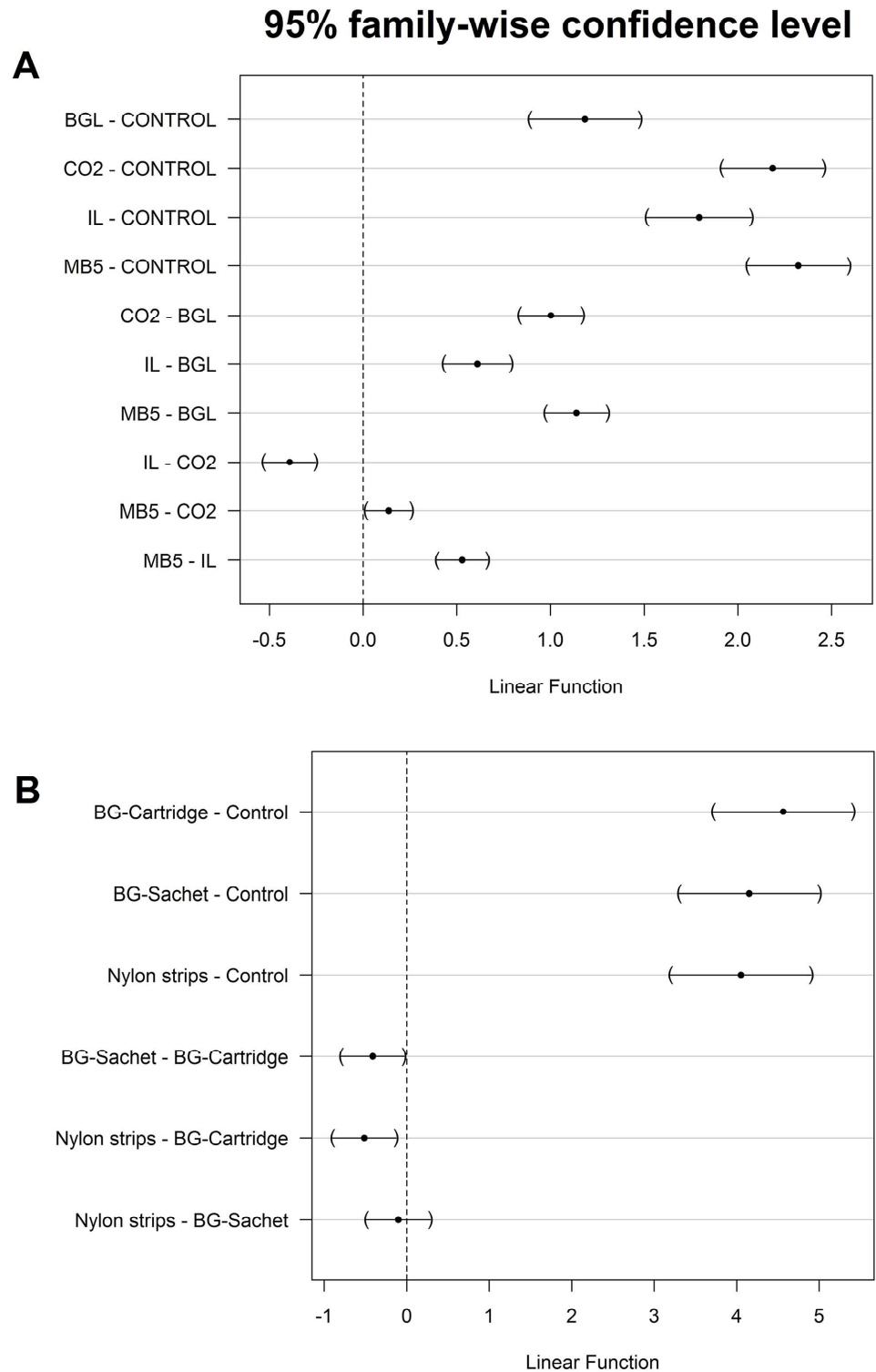


Fig 6. Results of pair-wise post hoc comparison using Tukey's honestly significance tests (Tukey's HSD). Showing similarities and differences between number of mosquitoes caught in traps baited with different lures (Panel A) and number of mosquitoes caught in traps baited with different lures dispensed from different media (Panel B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696.g006>

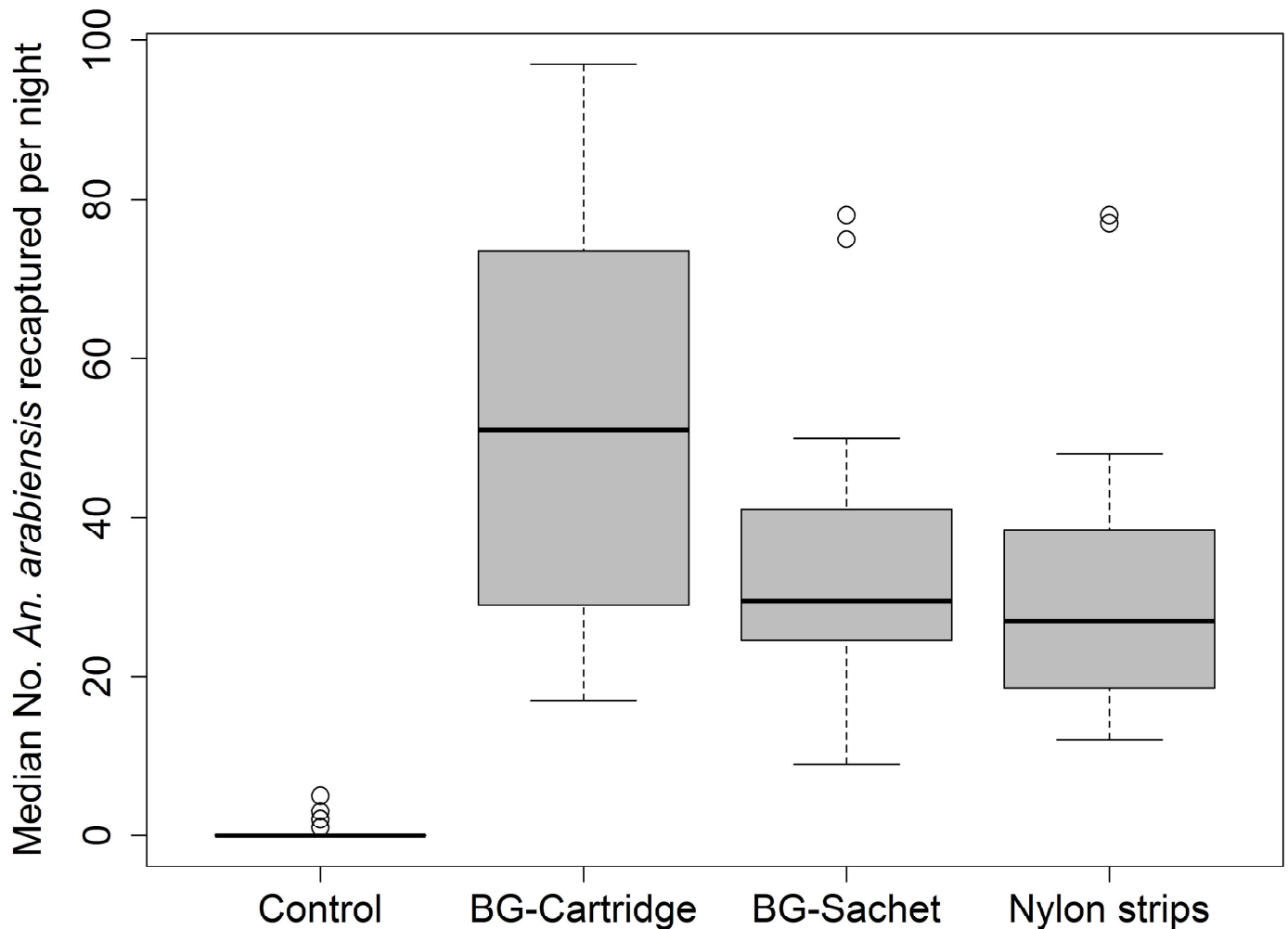


Fig 7. Distribution and median number of *Anopheles arabiensis* recaptured per night by BGM traps baited with Ifakara blend released by different odour-release devices in the semi-field system. BG-Cartridge and BG-Sachet refer to attractants infused inside microcapsules supplied by Biogents Company incased in a cylindrical plastic cartridge and plastic sachet, respectively; Nylon strips refer to batch of nylon strips where each strip is soaked in solution of a different constituent of the synthetic attractant; Control refers to an unbaited trap.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696.g007>

As with the BGS, the spacious interior of the BGM trap allows addition of a wide variety of attractants. Although it was originally proposed to be used with CO₂ as bait and the BG-Lure, it has in different occasions been tested when baited with different attractants. In this study, we tested four synthetic attractants and three attractant dispensing methods. We observed that the BGM would work with a variety of attractants. Of all candidate lures tested, the Mbita blend (MB5) tended to be the most attractive, though the differences in attractiveness between lures was not always significant. To evaluate synthetic blends, CO₂ was used as an effective mosquito attractant that also synergises other lures and activates mosquitoes [49, 50]. CO₂ is routinely added to enhance mosquito responses in laboratory and field studies with odour blends [15, 16, 31, 47, 51]. The same procedure was adopted in this study and a trap baited with CO₂ only was tested alongside an un-baited trap control to enable elucidation of any synergistic effects of CO₂ with other lures.

Our findings reveal that traps baited with the synthetic blend, MB5, caught the highest number of mosquitoes, compared to the BG-Lure. However, the other attractants also

performed well but there were no differences in the catches in traps baited with MB5, IB and CO₂. Post hoc analyses suggest minor differences between the lure types, but a clear differences between any of the lures and the controls. Since we found only a minor synergy between the CO₂ and the MB5 and IB attractants. This finding suggests that, for purposes of sampling the east African malaria vectors, BGM can be used with a variety of mosquito attractants and that even CO₂ alone, in this case derived from yeast-molasses fermentation, may by itself be appropriate. Therefore, where the intention is purely surveillance, rather than vector control, BGM offers significant improvements over BG sentinel traps and can be fitted with any of the multiple synthetic odour lures available commercially or readily in local communities, such as CO₂ derived from yeast-molasses fermentation.

The formulation of the MB5 contains ammonia, lactic acid, tetradecanoic acid, 3-methyl-1-butanol and butan-1-amine, and according to semi-field and field studies done in Kenya, it was shown to attract nearly as many mosquitoes as human subjects [38]. In addition, the MB5 was more attractive than IB, consistent with the findings of the present study. Even though the MB5 and IB share some candidate odorant constituents, the concentration of these chemical constituents may affect the responses of mosquitoes. A recent study demonstrated that attraction of mosquitoes to MB5 was concentration-dependent and that addition of 1-dodecanol to MB5 increased catches of female *An. gambiae* s.l. [36]. What is particularly important in this new study is that the MB5, being a far simpler blend of attractive constituents than IB, also tended to be the more attractive version. It is possible therefore, as concluded also by Okumu [31], that new odour mixtures can be developed with far superior attractiveness than any of the current blends.

Since their original tests, nylon strips are increasingly used as a matrix for dispensing attractant compounds [31, 33–36, 38]. In a comparison between LDPE and nylon strips, Mweresa *et al.* showed that releasing the IB from nylon strips caused a significantly higher attraction of *An. gambiae* [37]. Okumu *et al.*, [33] also reported this effect. However, the current study indicated that BG-Cartridge attracted consistently higher proportions of laboratory *An. arabiensis*. Although, the BG-Cartridge presented the best results in *An. arabiensis* attraction in our study, these findings were obtained in tests done for short periods, unlike the nylon strips that have been tested previously for long-term dispensation [34, 37]. A previous semi-field study done in western Kenya showed that nylon strips treated with IB remained attractive to host-seeking mosquitoes for up to 40 consecutive nights post-treatment [34]. These findings were extended up to one year in a western Kenya study [37], but apparently this last result was likely affected by bacteria that establish on strips over time producing additional compounds that attract host-seeking mosquitoes. Nonetheless, further studies about alternative and low-cost odour release devices considering the difference in release ratios of semio-chemicals are needed. Thus, the possible matrix should also be tested for their constant release and long-lasting residual activity on target mosquitoes.

One limitation of this study was that we did not compare the BGM to several other trap types, especially the human landing catches, currently considered the gold standard. However, we selected to compare the BGM against an already established outdoor mosquito sampling tool such as the BGS and did not consider it essential to compare it to HLC. Such studies could be done in the future. Our study instead was considered an initial assessment of the potential of BGM for sampling Afro-tropical malaria mosquitoes.

Conclusion

Earlier studies had already demonstrated that the BGM trap was highly effective for trapping the Brazilian malaria vector, *An. darlingi* [29, 30]. Here, we conclude that this trap is also

effective for capturing the African malaria vector, *An. arabiensis*. To ascertain whether BGM could be an effective representative field sampling tool for malaria mosquitoes, and possibly a substitute the human landing catch, additional tests in field settings in malaria endemic communities are recommended. Overall, we conclude that BGM has potential as an improved sampling tool for malaria vectors in Africa, and that its efficacy can be optimized by selecting appropriate odour baits and appropriate odour-dispensing systems.

Acknowledgments

We thank Mr. Joseph Mgando, who helped to take care of the laboratory-reared mosquitoes during the entire study period. We thank all our Ifakara Health Institute colleagues for their support during the work. EPAB was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Grant 88881.133584/2016-01) and AEE funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI) (Grant 310205/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant PPM-00502-15). FOO was funded by a Wellcome Trust Intermediate Research Fellowship (Grant WT102350/Z/13/Z) and a Visiting Researcher Fellowship from CNPq/MCTI, (Grant 42070/2013-2).

Author Contributions

Conceptualization: Elis P. A. Batista, Fredros O. Okumu, Alvaro E. Eiras.

Data curation: Halfan S. Ngowo.

Formal analysis: Halfan S. Ngowo, Mercy Opiyo.

Funding acquisition: Fredros O. Okumu, Alvaro E. Eiras.

Investigation: Elis P. A. Batista, Gasper K. Shubis, Felician C. Meza.

Methodology: Elis P. A. Batista, Fredros O. Okumu.

Resources: Fredros O. Okumu, Alvaro E. Eiras.

Supervision: Fredros O. Okumu, Alvaro E. Eiras.

Writing – original draft: Elis P. A. Batista, Alvaro E. Eiras.

Writing – review & editing: Elis P. A. Batista, Fredros O. Okumu, Alvaro E. Eiras.

References

1. Bhatt S, Weiss D, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015; 526(7572):207–11. <https://doi.org/10.1038/nature15535> PMID: 26375008
2. Reddy MR, Overgaard HJ, Abaga S, Reddy VP, Caccone A, Kiszewski AE, et al. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malaria Journal*. 2011; 10(1):184.
3. Moiroux N, Gomez MB, Pernetier C, Elanga E, Djènontin A, Chandre F, et al. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *Journal of Infectious Diseases*. 2012; 206(10):1622–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis565> PMID: 22966127
4. Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* ss from Cote d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1999; 15(1):53–9. PMID: 10342269
5. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, et al. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999; 77(3):230–4. PMID: 10212513

6. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: What are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*. 2011; 27(2):91–8. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004> PMID: 20843745
7. Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malaria Journal*. 2011; 10(80):80.
8. Gatton ML, Chitnis N, Churcher T, Donnelly MJ, Ghani AC, Godfray HCJ, et al. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution*. 2013; 67(4):1218–30. <https://doi.org/10.1111/evo.12063> PMID: 23550770
9. Govella NJ, Chaki PP, Killeen GF. Entomological surveillance of behavioural resilience and resistance in residual malaria vector populations. *Malaria Journal*. 2013; 12(1):124.
10. Geissbühler Y, Chaki P, Emidi B, Govella NJ, Shirima R, Mayagaya V, et al. Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. *Malaria Journal*. 2007; 6(1):126.
11. Dunn CE, Le Mare A, Makungu C. Malaria risk behaviours, socio-cultural practices and rural livelihoods in southern Tanzania: implications for bednet usage. *Social Science & Medicine*. 2011; 72(3):408–17.
12. Monroe A, Asamoah O, Lam Y, Koenker H, Psychas P, Lynch M, et al. Outdoor-sleeping and other night-time activities in northern Ghana: implications for residual transmission and malaria prevention. *Malaria Journal*. 2015; 14(1):35.
13. Mwangangi JM, Muturi EJ, Muriu SM, Nzovu J, Midega JT, Mbogo C. The role of *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coustani* in indoor and outdoor malaria transmission in Taveta District, Kenya. *Parasites & vectors*. 2013; 6(1):114.
14. Durnez L, Coosemans M. Residual transmission of malaria: An old issue for new approaches. *Anopheles mosquitoes—new insights into malaria vectors*. 2013:671–704.
15. Mmbando AS, Okumu FO, Mgando JP, Sumaye RD, Matowo NS, Madumla E, et al. Effects of a new outdoor mosquito control device, the mosquito landing box, on densities and survival of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, inside controlled semi-field settings. *Malaria Journal*. 2015; 14(1):1.
16. Hoel DF, Marika JA, Dunford JC, Irish SR, Geier M, Obermayr U, et al. Optimizing Collection of *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) in Biogents Sentinel Traps. *Journal of Medical Entomology*. 2014; 51(6):1268–75. <https://doi.org/10.1603/ME14065> PMID: 26309317
17. Matowo NS, Koekemoer LL, Moore SJ, Mmbando AS, Mapua SA, Coetzee M, et al. Combining Synthetic Human Odours and Low-Cost Electrocuting Grids to Attract and Kill Outdoor-Biting Mosquitoes: Field and Semi-Field Evaluation of an Improved Mosquito Landing Box. *PLoS one*. 2016; 11(1).
18. Matowo NS, Moore J, Mapua S, Madumla EP, Moshi IR, Kaingoda EW, et al. Using a new odour-baited device to explore options for luring and killing outdoor-biting malaria vectors: A report on design and field evaluation of the Mosquito Landing Box. *Parasites & Vectors*. 2013; 6:137.
19. Oketch F, Kotas M, Kihonda J, Killeen G, Moore S. Comparative evaluation of methods used for sampling malaria vectors in the Kilombero Valley, South Eastern Tanzania. *The Open Tropical Medicine Journal*. 2008; 1:51–5.
20. Dia I, Diallo D, Duchemin J-b, Ba Y, Konate L, Costantini C, et al. Comparisons of human-landing catches and odour-baited entry traps for sampling malaria vectors in Senegal. *Journal of Medical Entomology*. 2005; 42(2):104–9. PMID: 15799517
21. Jawara M, Smallegange RC, Jeffries D, Nwakanma DC, Awolola TS, Knols BG, et al. Optimizing odour-baited trap methods for collecting mosquitoes during the malaria season in The Gambia. *PLoS One*. 2009; 4(12):e8167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008167> PMID: 19997640
22. Okumu FO, Govella NJ, Moore SJ, Chitnis N, Killeen GF. Potential benefits, limitations and target product-profiles of odour-baited mosquito traps for malaria control in Africa. *PLoS One*. 2010; 5(7):e11573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011573> PMID: 20644731
23. Hiscox A, Otiemo B, Kibet A, Mweresa CK, Omusula P, Geier M, et al. Development and optimization of the Suna trap as a tool for mosquito monitoring and control. *Malaria Journal*. 2014; 13(1):257.
24. Costantini C, Gibson G, Brady J, Merzagora L, Coluzzi M. A new odour-baited trap to collect host-seeking mosquitoes. *Parassitologia*. 1993; 35(1–3):5. PMID: 7915027
25. Okumu FO, Madumla EP, John AN, Lwetoijera DW, Sumaye RD. Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odour-baited stations-The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasit Vectors*. 2010; 3:12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-12> PMID: 20193085
26. Kline DL. Comparison of two American biophysics mosquito traps: The professional and a new counter-flow geometry trap. *Journal of the American Mosquito Control Association—Mosquito News*. 1999; 15(3):276–82.

27. Kline DL. Evaluation of various models of propane-powered mosquito traps. *Journal of Vector Ecology*. 2002; 27:1–7. PMID: [12125861](#)
28. Kroeckel U, Rose A, Eiras ÁE, Geier M. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: Comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2006; 22(2):229–38. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[229:NTFSOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[229:NTFSOA]2.0.CO;2) PMID: [17019768](#)
29. Gama RA, Silva IMd, Geier M, Eiras ÁE. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013; 108(6):763–71. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013013> PMID: [24037199](#)
30. Rodrigues MS, Silva IM, Leal LB, Dos Santos CA Jr, Eiras ÁE. Development of a New Mosquito Retention System for the BG-Malaria Trap To Reduce The Damage To Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2014; 30(3):184–90. <https://doi.org/10.2987/14-6423R.1> PMID: [25843093](#)
31. Okumu FO, Killeen GF, Ogoma S, Biswaro L, Smallegange RC, Mbeyela E, et al. Development and field evaluation of a synthetic mosquito lure that is more attractive than humans. *PloS One*. 2010; 5(1): e8951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008951> PMID: [20126628](#)
32. Torr S, Hall D, Phelps R, Vale G. Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*. 1997; 87(03):299–311.
33. Okumu F, Biswaro L, Mbeleyela E, Killeen G, Mukabana R, Moore S. Using nylon strips to dispense mosquito attractants for sampling the malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Journal of Medical Entomology*. 2010; 47(2):274–82. PMID: [20380310](#)
34. Mukabana WR, Mweresa CK, Omusula P, Orindi BO, Smallegange RC, van Loon JJ, et al. Evaluation of low density polyethylene and nylon for delivery of synthetic mosquito attractants. *ParasitES & Vectors*. 2012; 5:202.
35. Mweresa CK, Mukabana WR, Omusula P, Otieno B, Gheysens T, Takken W, et al. Evaluation of textile substrates for dispensing synthetic attractants for malaria mosquitoes. *Parasite Vectors*. 2014; 7:376.
36. Mweresa CK, Mukabana WR, Omusula P, Otieno B, Van Loon JJA, Takken W. Enhancing attraction of African malaria vectors to a synthetic odor blend. *Journal of Chemical Ecology*. 2016; 42(6):508–16. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0711-1> PMID: [27349651](#)
37. Mweresa CK, Otieno B, Omusula P, Weldegergis BT, Verhulst NO, Dicke M, et al. Understanding the long-lasting attraction of malaria mosquitoes to odor baits. *PloS one*. 2015; 10(3):e0121533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121533> PMID: [25798818](#)
38. Mukabana WR, Mweresa CK, Otieno B, Omusula P, Smallegange RC, van Loon JJA, et al. A novel synthetic odorant blend for trapping of malaria and other African mosquito species. *Journal of Chemical Ecology*. 2012; 38(3):235–44. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0088-8> PMID: [22426893](#)
39. Smallegange RC, Takken W. Host-seeking behaviour of mosquitoes: responses to olfactory stimuli in the laboratory. *Olfaction in vector-host interactions*. 2010; 2:143–80.
40. Jawara M, Awolola TS, Pinder M, Jeffries D, Smallegange RC, Takken W, et al. Field testing of different chemical combinations as odour baits for trapping wild mosquitoes in The Gambia. *PLoS One*. 2011; 6(5):e19676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019676> PMID: [21637337](#)
41. Verhulst NO, Mbadi PA, Kiss GB, Mukabana WR, van Loon JJ, Takken W, et al. Improvement of a synthetic lure for *Anopheles gambiae* using compounds produced by human skin microbiota. *Malaria Journal*. 2011; 10(1):1.
42. Ferguson HM, Ng'habi KR, Walder T, Kadungula D, Moore SJ, Lyimo I, et al. Establishment of a large semi-field system for experimental study of African malaria vector ecology and control in Tanzania. *Malaria Journal*. 2008; 7(1):158.
43. Mweresa CK, Omusula P, Otieno B, Van Loon JJ, Takken W, Mukabana WR. Molasses as a source of carbon dioxide for attracting the malaria mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Malaria Journal*. 2014; 13:160. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-160> PMID: [24767543](#)
44. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015, URL <http://www.R-project.org>. 2016.
45. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:14065823*. 2014.
46. Schmied WH, Takken W, Killeen GF, Knols BG, Smallegange RC. Evaluation of two counterflow traps for testing behaviour-mediating compounds for the malaria vector *Anopheles gambiae* ss under semi-field conditions in Tanzania. *Malaria Journal*. 2008; 7(1):230.
47. Busula AO, Takken W, Loy DE, Hahn BH, Mukabana WR, Verhulst NO. Mosquito host preferences affect their response to synthetic and natural odour blends. *Malaria Journal*. 2015; 14(1):133.
48. Silver JB. *Mosquito ecology: Field sampling methods*: Springer Science & Business Media; 2007.

49. Gillies M. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): A review. *Bulletin of Entomological Research*. 1980; 70(04):525–32.
50. Dekker T, Geier M, Cardé RT. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *Journal of Experimental Biology*. 2005; 208(15):2963–72.
51. Menger D, Van Loon J, Takken W. Assessing the efficacy of candidate mosquito repellents against the background of an attractive source that mimics a human host. *Medical and Veterinary Entomology*. 2014; 28(4):407–13. <https://doi.org/10.1111/mve.12061> PMID: [24797537](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24797537/)

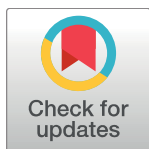
RESEARCH ARTICLE

Field evaluation of the BG-Malaria trap for monitoring malaria vectors in rural Tanzanian villages

Elis P. A. Batista^{1,2*}, Halfan Ngowo², Mercy Opiyo², Gasper K. Shubis², Felician C. Meza², Doreen J. Siria², Alvaro E. Eiras¹, Fredros O. Okumu^{2,3,4}

1 Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Environmental Health and Ecological Sciences Department, Ifakara Health Institute, Ifakara, Tanzania, **3** School of Public Health, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Parktown, Republic of South Africa, **4** Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

* ebatista@ihi.or.tz



OPEN ACCESS

Citation: Batista EPA, Ngowo H, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Siria DJ, et al. (2018) Field evaluation of the BG-Malaria trap for monitoring malaria vectors in rural Tanzanian villages. PLoS ONE 13 (10): e0205358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358>

Editor: Suzannah Rutherford, Fred Hutchinson Cancer Research Center, UNITED STATES

Received: March 24, 2018

Accepted: September 24, 2018

Published: October 8, 2018

Copyright: © 2018 Batista et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: EPAB was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Grant 88881.133584/2016-01) and AEE funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI) (Grant 310205/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant PPM-00502-15).

Abstract

BG-Malaria (BGM) trap is a simple adaptation of the widely-used BG-Sentinel trap (BGS). It is proven to be highly effective for trapping the Brazilian malaria vector, *Anopheles darlingi*, in field conditions, and the African vector, *Anopheles arabiensis*, under controlled semi-field environments, but has not been field-tested in Africa. Here, we validated the BGM for field sampling of malaria vectors in south-eastern Tanzania. Using a series of Latin-Square experiments conducted nightly (6pm-7am) in rural villages, we compared mosquito catches between BGM, BGS and human landing catches (HLC). We also compared BGMs baited with different attractants (Ifakara-blend, Mbita-blend, BG-Lure and CO₂). Lastly, we tested BGMs baited with Ifakara-blend from three odour-dispensing methods (BG-Cartridge, BG-Sachet and Nylon strips). One-tenth of the field-collected female *Anopheles gambiae s.l.* and *Anopheles funestus* were dissected to assess parity. BGM captured more *An. gambiae s.l.* than BGS ($p < 0.001$), but HLC caught more than either trap ($p < 0.001$). However, BGM captured more *An. funestus* than HLC. Proportions of parous *An. gambiae s.l.* and *An. funestus* consistently exceeded 50%, with no significant difference between methods. While the dominant species caught by HLC was *An. gambiae s.l.* (56.0%), followed by *Culex* spp. (33.1%) and *Mansonia* spp. (6.0%), the BGM caught mostly *Culex* (81.6%), followed by *An. gambiae s.l.* (10.6%) and *Mansonia* (5.8%). The attractant-baited BGMs were all significantly superior to un-baited controls ($p < 0.001$), although no difference was found between the specific attractants. The BG-Sachet was the most efficient dispenser for capturing *An. gambiae s.l.* (14.5(2.75–42.50) mosquitoes/trap/night), followed by BG-Cartridge (7.5(1.75–26.25)). The BGM caught more mosquitoes than BGS in field-settings, but sampled similar species diversity and physiological states as BGS. The physiological states of malaria vectors caught in BGM and BGS were similar to those naturally attempting to bite humans (HLC). The BGM was most efficient when baited with Ifakara blend, dispensed from BG-Sachet. We conclude that though BGM traps have potential for field-sampling of host-seeking African malaria vectors with representative physiological states, both BGM and BGS

FOO was funded by a Wellcome Trust Intermediate Research Fellowship (Grant WT102350/Z/13/Z) and a Visiting Researcher Fellowship from CNPq/MCTI (Grant 42070/2013-2). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

predominantly caught more culicines than *Anopheles*, compared to HLC, which caught mostly *An. gambiae s.l.*

Introduction

Between 2010 and 2015, there have been declines of more than 50% in malaria cases worldwide [1]. Intensification of vector control programs, such as use of insecticide treated bed nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS) is recognized as the major causes of this decline [2]. However, the World Health Organization (WHO) estimates that since 2016 the number of malaria cases is now increasing again [1] and in many low and middle-income endemic areas, such as different regions of Africa, Asia and South America, malaria and other mosquito-borne illnesses still remain major public health challenges [1, 3, 4]. Improved vector surveillance tools are needed to monitor epidemiological trends, measure impacts of current interventions, and identify areas requiring specific resources or interventions. Although difficult to achieve, such tools should be effective in different areas, so that the data obtained can be compared across regions. Besides, for these tools to be considered representative, they should capture similar species diversities and physiological states of mosquitoes as those that would normally bite humans.

In many residual transmission settings in Africa and South America, there is need to intensify measurements of transmission. In east and west Africa, widespread use of long-lasting insecticide treated bed nets (LLINs) and IRS has caused significant changes in the composition of malaria vector populations during the past decade [5–8]. Proportions of early-biting and outdoor-biting vectors have now risen, and as a result, available tools for monitoring the vectors are not sufficiently effective [9–11]. The human landing catch (HLC) remains the most effective method for collecting anophelines in these settings, although it is a dangerous procedure, which involves volunteers exposing their legs to potentially infectious mosquito bites, and may also be affected by inherent differences in attractiveness among the human volunteers [12]. Recent advances developed by Ifakara Health Institute and partners, such as the electric grid trap [13, 14] and the odour-baited mosquito landing boxes fitted with electric grids [15], appear to offer better and safer alternatives, but their application remains constrained by high costs, difficulties in battery power storage and risk of human contact with electric grid.

The BG-Sentinel trap (BGS) [16], developed by Biogents, Germany, is among the most widely used mosquito traps around the world. It is mostly used for surveillance of *Aedes* mosquitoes, but has also been tested for *Anopheles* mosquitoes [17–19]. Recently, the BG-Malaria trap (BGM) was conceived by adapting the BGS, with minor modification, to improve its efficacy for sampling *Anopheles* species, and was demonstrated as an efficacious method for monitoring malaria vectors in Brazil [20, 21]. The BGS and BGM traps differ in the airflow orientation, i.e., the BGM is set upside down, 40 cm above the ground [20–22]. This trap was demonstrated to be particularly effective for sampling the Brazilian malaria vector, *Anopheles darlingi*. In initial field tests conducted in Brazil, the BGM caught consistently more *An. darlingi* than the other commercial traps tested, including BGS and CDC light traps, and performed almost as well as HLC [20].

More recently in controlled semi-field trials conducted using laboratory-reared *Anopheles arabiensis* inside large screened-cages in Tanzania, the BGM was consistently better than BGS [22]. No such tests have however been conducted with wild free-flying malaria mosquitoes anywhere in Africa. Here, we evaluated the BGM for field sampling of malaria vectors in three

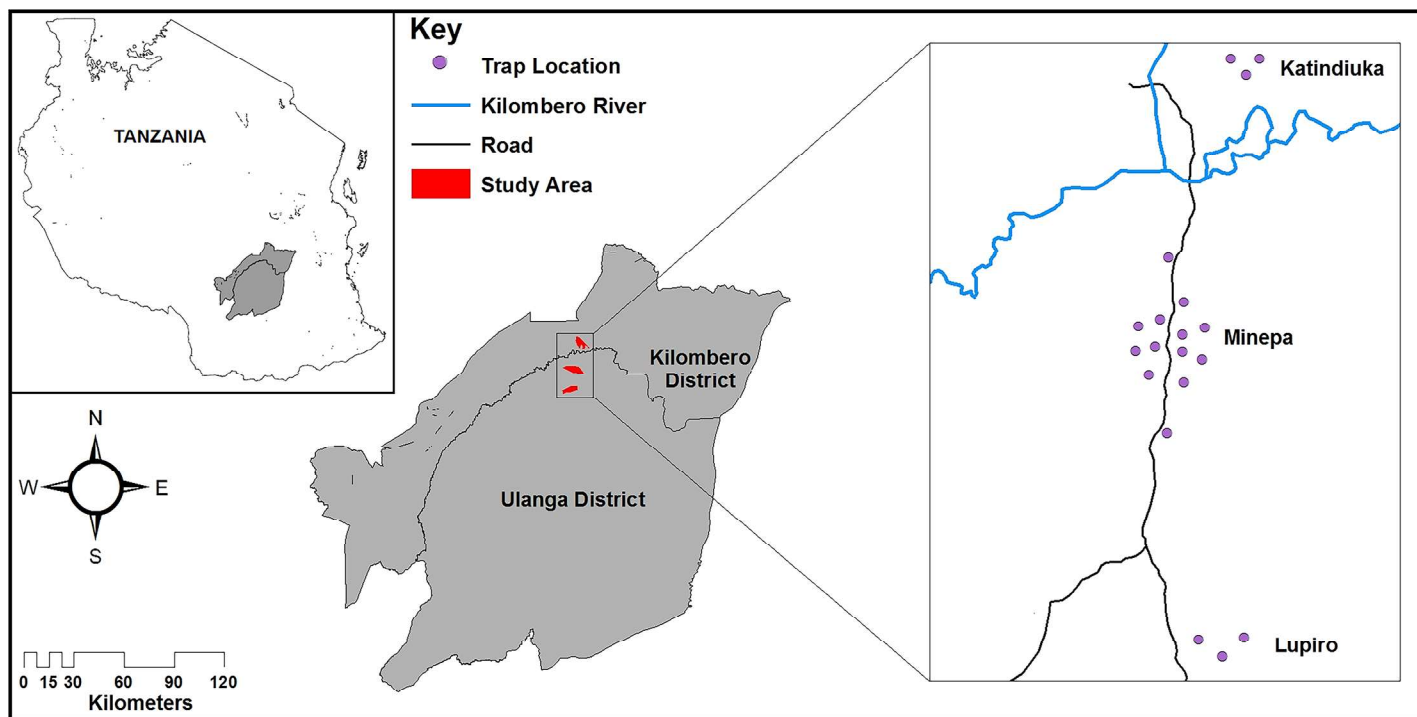


Fig 1. Map of the study area showing the trap positions (circles) in the villages in Ulanga and Kilombero districts in Tanzania, where the study was conducted.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.g001>

rural malaria endemic villages in south-eastern Tanzania. This current study was therefore also meant to validate the efficacy of the BGM as previously shown in Brazilian field studies [20, 21] and the Tanzania semi-field studies [22].

Methods

Study area

The work was conducted in three villages in Ulanga (Katindiuka village) and Kilombero (Minepa and Lupiro villages) districts in rural south-eastern Tanzania (Fig 1). The daily mean temperature in the area ranges from 20°C to 32.6°C. The rainfall varies between 1200 to 1600mm, annually, with a main rainy season from March to May and a short rainy season during October to December. The other months of the year, January-February and June-September, correspond to the hot and cold dry seasons, respectively. This region is a perennially meso-endemic malaria area, where the vectors comprise primarily *Anopheles funestus* and *Anopheles gambiae s.l.* complex, of which *Anopheles arabiensis* constitute >99% of the complex [15, 23–25]. *Anopheles rivulorum* is also often incriminated with *Plasmodium* sporozoites, maybe an important secondary vector species in the area [26].

Mosquito sampling methods

BG-Sentinel trap (BGS). The BGS (Biogents HmGb, Regensburg, Germany), shown in Fig 2, is a collapsible, waterproof fabric cylindrical container white trap, measuring 35cm in diameter and 40cm in height [16]. At the centre of the trap there is a black collecting tube of 12cm diameter and 30cm height) with a bag for the collection of mosquitoes. A 12 volt electric fan measuring 14cm in diameter and powered by 12 volt battery, produces a continuous downward flow of air, which hits the floor of the trap and exits through a gauze cover on the

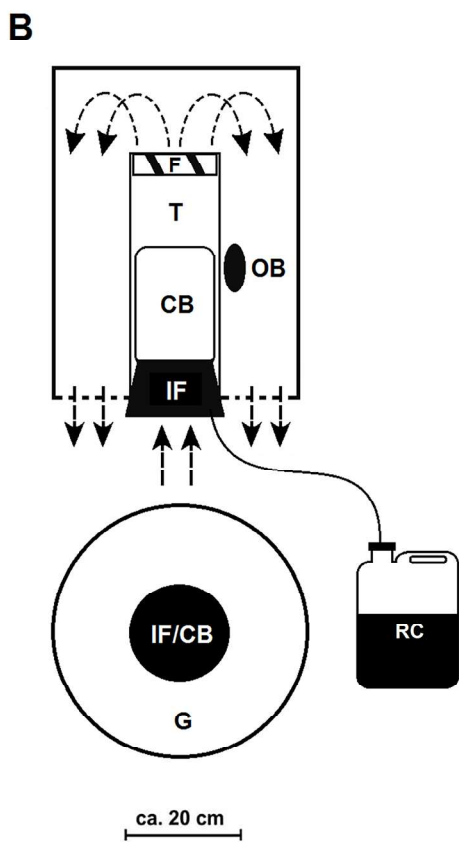
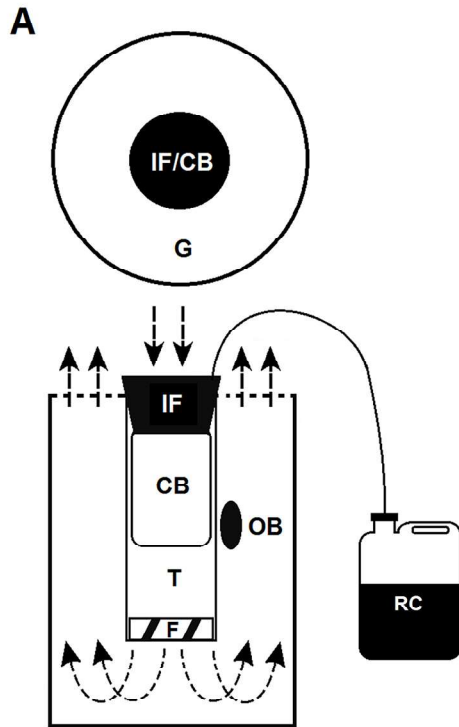


Fig 2. Sampling methods: (A) BG-Sentinel and (B) BG-Malaria. The functionality of the traps is shown on the left panel, while the installation in field is shown on the right panel of the figure. IF = Intake funnel; CB = Catch Bag; F = Fan; G = Gauze Cover; T = Tube; RC = Recipient of CO₂; OB = Odour Bait. Arrows indicate the direction of the airflow. Adapted from Batista *et al.*, [22].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.g002>

top of the trap. The downward air current produced by the fan draws in the mosquitoes that approach the collecting tube. The spacious interior allows for addition of a wide variety of attractants, odours which exit through the gauze cover and serve to lure mosquitoes to the collecting tube. The trap was installed outdoors with the entry at 40cm above the floor.

BG-Malaria trap (BGM). The BGM is a simple adaptation of BGS trap and has been described in detail by both Gama *et al.* [20] and Batista *et al.* [22]. The BGM is hung upside down, at 40cm above the ground, and has an electrical fan (12V, 14cm diameter, powered by a 12 volt battery), which produces an upward suction that captures mosquitoes approaching the trap [20]. In the studies done by Gama *et al.* [20], the BGM was also tested with different black and white patterns to create a level of contrast essential for host seeking mosquitoes. However in this current set-up, the main difference between the two traps is the airflow orientation. The BGM was also installed outdoors with the entry at 40cm above the floor, as illustrated by Fig 2.

Human landing catch (HLC). As a standard reference, human landing catches were conducted outdoors nightly by trained volunteers, with field experience in the collection of mosquitoes. The volunteers were all men, aged between 21–33 years old. Informed consent was obtained from all the participants as described under the ethics considerations section. In each test, we worked with two volunteers, each working for a maximum of six hours a night.

Mosquito attractants tested

BG-Lure. The BG-Lure (Biogents HmGb, Regensburg, Germany) consists of a mixture of ammonia, L-lactic acid and caproic acid in undeclared proprietary concentrations. It was used in the second experiment to identify a comparatively effective lure for field use when sampling mosquitoes with a BGM trap. This attractant was purchased directly from the manufacturer.

Mbita-5 Lure (MB5). The MB5 was originally tested in western Kenya and consists of ammonia (2.5%), lactic acid (85%), tetradecanoic acid (0.00025%) and 3-methyl-1-butanol (0.000001%) [27]. This attractant was also supplied by the manufacturer Biogents Company and was used in the second experiment.

Ifakara blend (IB). The Ifakara blend was originally developed and tested at Ifakara Health Institute in Tanzania and has been widely used for trapping malaria mosquitoes because of its ability to attract representative proportions of different mosquito species, similar to those that are typically attracted by humans [28]. This synthetic blend consists in a mixture of ammonia (2.5%), L-lactic acid (85%), propionic acid (0.1%), butanoic acid (1%), pentanoic acid (0.01%), 3-methylbutanoic acid (0.001%), heptanoic acid (0.01%), octanoic acid (0.01%) and tetradecanoic acid (0.01%) [28]. Unlike the BG-Lure and MB5, which were used only in the second experiment, this attractant was used in all the experiments in this study. The IB was also supplied by Biogents.

Carbon dioxide gas (CO₂). In all the experiments, the lures were supplemented with CO₂ gas, produced from yeast-molasses fermentation, to activate mosquitoes and synergize the attractive effects [29, 30]. In addition, in the experiments where the lures were compared, we also had a separate configuration where CO₂ was the only bait in the BGM trap. Thus, we were able to separate effects of the CO₂ gas itself. The CO₂ was prepared using 500g molasses and 35g yeast mixed in 2 litres of water [31]. The mix was placed into a 5L plastic container and was delivered through a 60cm long silicon tubing (0.5cm diameter).

Odour-dispensing methods

Microcapsules encased in a plastic cartridge (here referred to as BG-Cartridge and also supplied by Biogents) were used as dispensers for all the synthetic attractants in the experiments. However, for the experiment where odour-dispensing devices were tested, two other dispensers were added. The first was a batch of nylon strips, where each strip (measuring 26.5 x 1 cm) was soaked in a solution of a different constituent of the Ifakara blend as originally described by Okumu *et al.* [32]. The second dispensing device added was the BG-Sachet (also supplied by Biogents), which consisted of the microcapsules of the IB odorant constituents encased inside a thin plastic low-density polyethylene sachet.

Study procedures

A series of experiments were conducted nightly between 06.00 P.M. and 07.00 A.M. in rural villages in south-eastern Tanzania to address the following three key questions: a) how efficacious is the BGM compared to BGS and HLC for sampling free-flying mosquitoes; b) which of the four mosquito attractants, i.e., BG-Lure + CO₂, MB5 + CO₂, IB+ CO₂ or CO₂ alone, is the most efficacious for baiting BGM; and c) which of the three dispensing methods, i.e., the nylon strips, the BG-cartridges or the BG-sachets, is the most efficacious for dispensing the IB in the BGM traps. All the experiments were conducted outdoors during the rainy season between the months of April and May of 2016.

Experiment 1: Comparison of sampling methods for field collection of mosquitoes. To compare sampling methods for catching African malaria mosquitoes, three methods were selected and evaluated in the field. These included BGM, BGS and HLC. The methods were comparatively evaluated using a 3 x 3 Latin square experiment replicated four times, over 12 nights, and repeated in three different villages. However, in Minepa, additional collections were done to improve sampling effort, so that there were a total of 72 trap nights in that village, compared to 12 trap nights in each of the other two villages. In total, there were 96 trap nights for each of the sampling methods. The BGM and BGS traps were baited with the synthetic mosquito lure, Ifakara blend (IB) [28] supplemented with CO₂ as described above and were set with the opening at approximately 40 cm above the ground level (Fig 2). The HLC was conducted outdoors by two volunteers, the first volunteer working from 06.00 P.M. until midnight, and the second volunteer working between midnight and 07.00 A.M. The traps were thoroughly cleaned every morning after the end of the nightly experiments.

To assess whether the traps were capturing mosquitoes of similar physiological state as those that naturally attempt to bite humans (represented by HLC), approximately 10% of the female *An. gambiae* and *An. funestus* collected by each method were dissected under a stereo light microscope. The dissected ovaries observed under 10X magnification under a compound microscope to determine the parity status (presence of stretched, i.e., parous or coiled tracheolar skeins, i.e., nulliparous) [33].

Experiment 2: Comparison of attractants used for baiting the BG Malaria traps. To identify the most effective mosquito lure that can be used with the BGM trap for sampling host-seeking *Anopheles* mosquitoes, a 5 x 5 Latin square experiment was conducted. Five BGM traps, placed at five different locations, of which four were baited with either of the four candidate lures, and a fifth BGM was un-baited and used as control. The five different treatments compared in this experiment were a) IB supplemented with CO₂; b) BG-Lure supplemented with CO₂; c) MB5 supplemented with CO₂; d) CO₂ alone; and e) Control (an unbaited trap). The treatments were randomly rotated across all the five locations nightly. The traps were thoroughly cleaned every morning after the end of the nightly experiments. The experiment

was replicated four times, amounting to 20 sampling nights for each treatment, during which each bait type had been to each of the locations four times.

Experiment 3: Comparison of the odour-dispensing devices used in the BG Malaria trap. Here, methods dispensing the synthetic mosquito attractants were evaluated to determine which was the most efficacious for use in the BGM. Only the IB candidate attractant was used. We compared nightly mosquito catches in BGM traps baited with the IB [28], but dispensed from either: a) nylon strips [32], b) BG-Sachet or c) BG-Cartridge. A non-baited trap was used as control, so that there were four traps being evaluated. Each night, the traps were placed at four different locations, and the position of the dispensers rotated nightly. The traps were thoroughly cleaned every morning after the end of the nightly experiments. The devices were rotated in four positions in a 4 x 4 Latin square design with 5 replicates, totalling 20 sampling nights for each device, during which each dispenser had been to each of the locations five times.

Processing of samples

Every morning, the mosquitoes collected during the experiments were transported to the Ifakara Health Institute Vector Laboratory (the VectorSphere) for sorting, identification and counting. Morphological classification was used to group the adults as members of the *An. gambiae* complex, *An. funestus* group, other *Anopheles* species, or culicines. A sub-sample of the *An. gambiae s.l.* and *An. funestus* mosquitoes of the different species were kept in micro-centrifuge tubes with silica gel for further analysis by Polymerase Chain Reaction (PCR) to identify sibling species.

Data analysis

The analysis was done using R software version 3.3.2 [34]. In all experiments, Generalized Linear Mixed Effects Statistical Models (GLMMs) in the *lme4* package were used to estimate the number of female mosquitoes of each taxon captured as a function of the different sampling methods, lures or dispensing devices. To account for the over-dispersion in the field data, number of mosquitoes captured (i.e., the mosquito count data of each taxon) were modeled following a negative binomial distribution with log link function [35]. In the first experiment, the main fixed effects were trap type. However, in the second experiment (testing the effect of different lures on the number of mosquito captured), the main fixed effect was type of lure, and in the last experiment (testing the effect of different odour dispensing mechanism), the main fixed effect was type of dispensing devices. To account for the variation in temperatures, winds and any other confounding factors during the study period, the experiment date and trap locations were treated as random factors for each analysis in respective experiments. Relative rates (RR) and 95% Confidence Intervals (CI) were used to estimate the relative influence of each fixed effect. In the parity status experiment, GLMM with binomial likelihood for proportion data in the *lme4* package were used [35]. Proportions of parous mosquitoes were modeled as a function of trap type, while experimental date and trap location was treated as random factors. The estimates of all experiments were considered statistically significantly different if $p < 0.05$. Additionally, pairwise comparison tests were done using Tukey's honest significance difference post-hoc test (Tukey's HSD) to assess differences between individual groups.

Ethical considerations

Volunteers participating in the study were adequately informed of the study objectives, potential benefits and potential risks, after which written informed consent was obtained. Adequate

Table 1. Mosquito catches, grouped by taxa, with median number and Interquartile range (IQR) of mosquitoes caught per night by different sampling methods in the study.

Species	Human Landing Catch			BG-Malaria Trap			BG-Sentinel Trap		
	Median catch/night (IQR)	Total catch	Proportion	Median catch/night (IQR)	Total catch	Proportion	Median catch/night (IQR)	Total catch	Proportion
<i>Anopheles gambiae</i> s.l.	39 (15.5–9.0)	6369	56.0%	5.5 (1.0–15.25)	1083	10.2%	1.5 (0.0–6.25)	691	7.6%
<i>Anophels funestus</i>	0 (0–1)	71	0.6%	0 (0–1)	83	0.8%	0 (0–0)	52	0.6%
<i>Anopheles coustani</i>	1 (0–2)	354	3.1%	0 (0–1)	92	0.9%	0 (0–0)	64	0.7%
<i>Anopheles pharoensis</i>	0 (0–0)	58	0.5%	0 (0–0)	1	0.0%	0 (0–0)	3	0.0%
<i>Anopheles ziemani</i>	0 (0–0)	11	0.1%	0 (0–0)	1	0.0%	0 (0–0)	15	0.2%
<i>Anopheles squamosus</i>	0 (0–0)	33	0.3%	0 (0–0)	9	0.1%	0 (0–0)	6	0.1%
<i>Culex</i> spp.	32 (15.0–54.25)	3757	33.1%	66.5 (22.5–142.0)	8627	81.6%	59 (23.5–103.0)	7821	85.9%
<i>Mansonia</i> spp.	2 (0–10)	677	6.0%	2 (0–5.25)	617	5.8%	1 (0–5)	382	4.2%
<i>Aedes</i> spp.	0 (0–0)	25	0.2%	0 (0–0)	38	0.4%	0 (0–0)	21	0.2%
<i>Coquillettidia</i> spp.	0 (0–0)	11	0.1%	0 (0–0)	25	0.2%	0 (0–0)	54	0.6%
Total		11366	100%		10576	100%		9109	100%

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.t001>

training on experimental procedures was given to the volunteers. All volunteers participating in mosquito experiments had access to weekly diagnosis of malaria and treatment if they became unwell, but no volunteer in this experiment became unwell. Ethical approval for the study was obtained from Ifakara Health Institute IRB (IHI/IRB/No: 34–2014) and Medical Research Coordination Committee of the National Institute of Medical Research (Certificate No. NIMR/HQ/R.8a/Vol.IX/1903).

Results

Efficacy of BGM relative to other mosquito sampling methods: mosquito counts and vector species diversities

During the study period, a total of 31,051 mosquitoes were captured between all the sampling methods tested, representing five genera comprising *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Aedes* and *Coquillettidia* (Table 1). As malaria vectors were the prime focus of interest in this study, further analyses was done on *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* mosquitoes.

The number of *An. gambiae* s.l. caught was influenced significantly by type of sampling method used ($p < 0.001$) (Table 2). Nevertheless, BGM and BGS captured similar numbers of *An. funestus* compared to HLC (RR = 1.2, 95%CI: (0.62–2.32), $p = 0.587$) and (RR = 0.71 (0.36–1.39, $p = 0.314$), respectively.

Efficacy of BGM relative to other mosquito sampling methods: Parity rates

Approximately 10% (804/8349) of the *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* females collected in these experiments were dissected to determine their parity status. Proportions of parous *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* exceeded 50% with all methods, but no significant difference in

Table 2. Estimation of sampling efficiency of the different sampling methods used (per night) relative to the human landing catch.

Trap	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>			<i>Anopheles funestus</i>		
	Mean Catch ± SE	OR (95%CI)	p value	Mean Catch ± SE	OR (95%CI)	p value
Human Landing Catch	66.34 ± 6.5	1	N/A	0.74 ± 0.2	1	N/A
BG-Malaria	11.28 ± 1.5	0.16 (0.11–0.24)	<0.001	0.86 ± 0.2	1.20 (0.62–2.32)	0.587
BG-Sentinel	7.20 ± 2	0.08 (0.05–0.12)	<0.001	0.54 ± 0.1	0.71 (0.36–1.39)	0.314

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.t002>

parity rates was observed between the methods (Fig 3). The highest parity rate was observed in BGS, where 80% of the *An. funestus* dissected were parous, but the overall number of *An. funestus* dissected was limited compared *An. gambiae s.l.*

Efficacy of mosquito lures used for baiting the BGM

The total numbers of mosquitoes collected in the second experiment, where different synthetic attractants were tested with the BGM trap, are shown in Table 3. As expected, the lowest number of *An. gambiae s.l.* was collected by the unbaited trap, which was significantly lower than any of the other traps ($p < 0.001$) (Table 4). Pair-wise comparison test using Tukey’s HSD showed that there is significant difference between the pairs formed by each treatment and control (CO_2 –control [$z = 5.04, p < 0.001$], BG-Lure–control [$z = 4.82, p < 0.001$], MB5 –control [$z = 5.05, p < 0.001$], IB–control [$z = 5.19, p < 0.001$]). The rest of the pairs were not significantly different from one another.

Efficacy of different odour-dispensing devices used in the BGM

The total number of mosquitoes collected in the third experiment, where different devices were tested for dispensing the IB in the BGM trap, is shown in Table 5. A total of 10,448 mosquitoes were collected, distributed in five genera. The proportional composition of mosquitoes

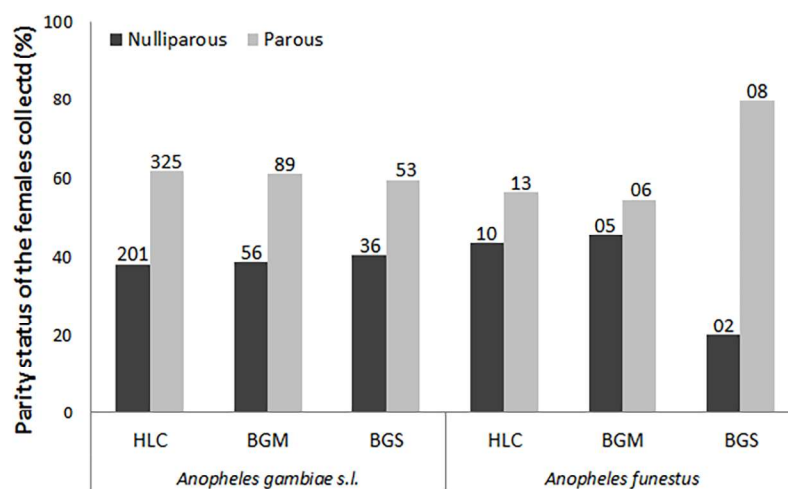


Fig 3. Percentage of parous mosquitoes observed among collections using human-landing catches (HLC), BG-Malaria (BGM) and BG-Sentinel (BGS) traps. The number of mosquitoes dissected per method is included at the top of the bars.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.g003>

Table 3. Mosquito catches, grouped by taxa, caught by BG-Malaria traps baited with different lures (CO₂ gas, BG-Lure, Mbita-5 Blend, Ifakara blend or no bait, i.e., control).

Species	Control		CO ₂		BG-Lure		Mbita-5 Blend		Ifakara Blend	
	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)
<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	0 (0–0)	4 (20%)	1 (0–3.5)	158 (19.7%)	1 (0–0)	89 (16.2%)	2 (0.75–6.25)	126 (19.4%)	2 (0–5)	115 (12.7%)
<i>Anopheles funestus</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	2 (0.4%)	0 (0–0)	4 (0.6%)	0 (0–0)	4 (0.4%)
<i>Anopheles coustani</i>	0 (0–0)	1 (5%)	0 (0–0.25)	11 (1.4%)	0 (0–0)	22 (4%)	0 (0–1)	13 (2%)	0 (0–1.25)	114 (12.5%)
<i>Anopheles pharoensis</i>	0 (0–0)	1 (5%)	0 (0–0)	2 (0.3%)	0 (0–0)	2 (0.4%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	12 (1.3%)
<i>Anopheles ziemani</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	1 (0.2%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	0 (0%)
<i>Anopheles squamosus</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	1 (0.1%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	0 (0%)
<i>Culex spp.</i>	0 (0–0.25)	11 (55%)	11 (3.75–40.75)	519 (64.7%)	10 (3–23.25)	374 (68.1%)	13 (3.25–35.75)	444 (68.3%)	9 (4.75–47.25)	551 (60.7%)
<i>Mansonia spp.</i>	0 (0–0)	3 (15%)	1 (0–4)	109 (13.6%)	0 (0–0)	54 (9.8%)	1 (0–5)	59 (9.1%)	1 (0–5)	103 (11.3%)
<i>Aedes spp.</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	1 (0.1%)	0 (0–0)	3 (0.5%)	0 (0–0)	3 (0.5%)	0 (0–0)	4 (0.4%)
<i>Coquillettidia spp.</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	1 (0.1%)	0 (0–0)	2 (0.4%)	0 (0–0)	1 (0.1%)	0 (0–0)	6 (0.7%)
Total		20		802		549		650		909

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.t003>

of different species making up the total catch remained consistent with the first and second experiments. Here, 83.5% of all the mosquitoes caught were *Culex* spp., 10.5% were *An. gambiae s.l.*, and 3.8% were *Mansonia* spp. (Table 5). All the odour-dispensing devices performed significantly better than control for capturing *An. gambiae s.l.* mosquitoes, with BG-Sachet being the best odour-dispensing system [RR = 70.71 (23.59–212.00)], $p < 0.001$], followed by BG-Cartridge [RR = 48.46 (16.15–145.44), $p < 0.001$] and nylon strips [RR = 18.67 (6.08–57.35), $p < 0.001$]. The Tukey’s pair-wise comparison showed a difference between BG-Sachet and nylon strips ($z = 2.78$, $p < 0.05$), but none of the other pairs were significantly different (Table 6).

Table 4. Estimation of sampling efficiency of BG-Malaria traps baited with different lures (per night) relative to control (unbaited trap)*.

Lure	Mean Catch ± SE	OR (95%CI)	p value
Control	0.20 ± 0.15	1	N/A
CO ₂	7.90 ± 3.83	29.45 (7.90–109.72)	<0.001
BG-Lure	4.45 ± 1.66	26.16 (6.93–98.70)	<0.001
Mbita-5	6.30 ± 2.45	30.03 (8.69–112.3)	<0.001
Ifakara Blend	5.75 ± 2.43	32.23 (8.69–119.56)	<0.001

* Analysis was only done for *Anopheles gambiae s.l.*, *Anopheles funestus* were too few to perform a robust analysis

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.t004>

Table 5. Mosquitoes, grouped by taxa, caught by BG-Malaria traps baited with Ifakara blend released by different odour-dispensing devices (BG-Cartridge, BG-Sachet, Nylon strips or no bait, i.e., control).

Species	Control		BG-Cartridge		BG-Sachet		Nylon Strips	
	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)	Median catch/night (IQR)	Total catch (Proportion)
<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	0 (0–1)	8 (4.3%)	7.5 (1.75–26.25)	388 (11.7%)	14.5 (2.75–42.50)	555 (15.7%)	4.5 (0–10)	145 (4.2%)
<i>Anopheles funestus</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	5 (0.2%)	0 (0–2.5)	33 (1%)	0 (0–0)	17 (0.5%)
<i>Anopheles coustani</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–1)	29 (0.9%)	0 (0–1)	47 (1.2%)	0 (0–1)	17 (0.5%)
<i>Anopheles pharoensis</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	7 (0.2%)	0 (0–0)	5 (0.2%)	0 (0–0)	0 (0%)
<i>Anopheles ziemani</i>	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	1 (0.03%)
<i>Anopheles squamosus</i>	0 (0–0)	1 (0.5%)	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	3 (0.1%)	0 (0–0)	20 (0.6%)
<i>Culex</i> spp.	5 (0–10.5)	173 (94.1%)	128.5 (48.0–177.25)	2641 (79.9%)	133 (52.5–180.25)	2770 (78.6%)	131 (74.25–227.0)	3137 (91.8%)
<i>Mansonia</i> spp.	0 (0–0)	2 (1.1%)	4 (0–8.25)	222 (6.7%)	4 (0–7.25)	108 (3.1%)	0.5 (0–7)	69 (2%)
<i>Aedes</i> spp.	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0.25)	6 (0.2%)	0 (0–0)	1 (0.03%)	0 (0–0.25)	6 (0.2%)
<i>Coquillettidia</i> spp.	0 (0–0)	0 (0%)	0 (0–0)	5 (0.2%)	0 (0–0)	4 (0.1%)	0 (0–0)	7 (0.2%)
Total		184		3303		3526		3419

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.t005>

Identification of sibling species of *Anopheles gambiae s.l.* and *Anopheles funestus* group

A sub-sample of the mosquitoes visually identified as *An. gambiae s.l.* and belonging to the *An. funestus* group were tested using PCR to identify their species. Of the 442 *An. gambiae s.l.* tested, DNA from 419 (94.8%) were successfully amplified, and all these mosquitoes were identified as *An. arabiensis* (100%). The amplification rate for the *An. funestus* group was 94.5% (52/55), of which 61.5% were *An. funestus s.s.* Giles, 32.7% were *Anopheles leesoni* and 5.8% were *An. rivulorum*.

Discussion

This current study is the first field validation of the BGM in Africa and provides initial evidence of its performance against wild free-flying mosquitoes. To validate the potential of BGM

Table 6. Pair-wise post hoc comparison using Tukey’s honestly significance tests (Tukey’s HSD) showing similarities and differences between number of *Anopheles gambiae* caught by BG-Malaria traps baited with Ifakara blend released by different odour-dispensing devices.

Treatment pairs*	z value	p value
BG-Sachet/BG-Cartridge	0.85	0.827
BG-Sachet/Nylon strips	2.93	<0.05
BG-Sachet/Control	7.60	<0.001
BG-Cartridge/Nylon strips	2.11	0.147
BG-Cartridge/Control	6.92	<0.001
Nylon strips/Control	5.11	<0.001

*The pairs are listed according to the effectiveness of the odour-dispensing devices.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358.t006>

for surveillance of disease-transmitting mosquitoes, particularly malaria vectors, we designed field experiments to compare it with existing standard sampling methods and commercially available traps, HLC and BGS. We also tested different attractants and odour-dispersing devices to use with the BGM. The BGS trap originally was designed for capturing *Aedes aegypti* [16], the vector of dengue fever, zika virus and chikungunya, but it has also been shown to be an effective sampling method for anophelines [17, 36–38]. In previous studies where BGS was compared to Suna Trap, CDC light trap and Mosquito Magnet X (MM-X) trap, the BGS trap caught higher numbers of *An. gambiae s.l.* than these other traps [39]. Schmied *et al.* [17] also demonstrated a higher catching efficiency for *An. gambiae s.s.* when compared to the MM-X trap in a semi-field setting.

Earlier studies in Brazil demonstrated that a minor adaptation of the BGS, involving using it upside down and using a black and white colour pattern, resulted in significantly higher catches [20]. These results recently have been validated in a semi-field assessments in Tanzania where the adaptation (i.e., the BGM) was evaluated against BGS [22]. In those semi-field tests, the BGM proved to be more efficient in catching the malaria vector *An. arabiensis* than BGS [22]. In this study, the superior performance of the BGM trap over the BGS trap in terms of nightly mosquito catches was also observed in the field. The BGM trap caught almost double the number of *An. gambiae s.l.* and also a higher number of mosquitoes from the other genera (*Culex*, *Mansonia* and *Aedes*). These results suggest that the BGM trap could be used for monitoring various mosquito vectors of human pathogens, including the malaria vectors. One clear disadvantage, however, is that though HLC caught mostly *An. gambiae* (constituting 56% of total catches), both BGM and BGS predominantly caught *Culex* mosquitoes (constituting >80% of total catches), with *An. gambiae* being only about 10% of overall catches. This is an important parameter to assess representativeness of the BGM and BGS traps when used for surveillance of disease-transmitting mosquitoes.

Several attempts have been made to identify improved surveillance options for host-seeking mosquitoes, but a clear replacement for human landing catches remains elusive. Although there is no trapping device available that can successfully compete with HLC, the BGM trap previously has captured similar numbers of *An. darlingi*, the main vector of malaria in Brazil [20]. In the present study, the BGM trap captured more *An. funestus*, a species that is also a very anthropophilic mosquito, and it is a competent malaria vector [40], just like *An. gambiae s.s.*, which is considered the most important vector species in Africa [41]. However, the number of *An. funestus* in this study was very low, so this specific outcome cannot be considered conclusive.

Due to large-scale use of vector control interventions such as LLINs and IRS, *An. gambiae s.s.* populations have decreased significantly, and there has also been a shift in the composition of malaria vector species in many places. Since 2000, particularly in the period following massive scale-up of LLINs, many sites in East Africa have reported that *An. arabiensis* is becoming the most abundant malaria vector [5, 42, 43], although *An. funestus*, which occurs in far lower densities than the former, is clearly the more dominant vector, transmitting nearly nine out of every ten new malaria cases in rural south eastern Tanzania [23]. Moreover, while *An. arabiensis* presents an opportunistic behaviour, feeding both on humans and animals [44, 45], *An. funestus* preferentially feeds on humans. Its persistence as well the high sporozoite prevalence rates it harbours, consequently leads to far greater increases in entomological inoculation rates (EIR). This has been reported by Lwetoijera *et al.* [43] and by Kaindoa *et al.* [26], both of whom showed that *An. funestus* is a highly efficient malaria vector in the same area in rural Tanzania, where the current study was conducted. Overall, monitoring these vector dynamics require a new set of sampling tools that are easy to use, low cost and standardisable across

settings, but also those that can measure the core behaviour of the vectors such as their biting behaviours [46].

In recent years, certain major breakthroughs have been made in the search for better surveillance methods. Examples include development of highly effective synthetic lures similar to natural host odours [27, 28] and recent development of the mosquito electrocuting trap [13, 14] and the MosqTent [47], which compared sufficiently with human landing catches when field-tested for sampling malaria vectors. Although comparable to HLC, these mentioned traps are based on the same system, regardless protection, the presence of a volunteer is still required, which can be susceptible to an error bias due to the difference in attractiveness among humans, thus hindering the standardization of such methods. Therefore, the use of traps with synthetic attractants, which mimic human odours without exposing them to risks, can be an alternative to these methods. In this context, the combination of odour-baited devices with electric grids [15], and the recent adaptation of BGS to form BGM, which also proved very efficient when compared against human landing catches for field-collections of *An. darlingi* [20], are good examples. Our findings offer new evidence for the performance and potential of the BGM in African settings, where despite having lower catches than HLC, it could be an improvement over the current alternatives such as BGS.

According to Mboera [48], a trap can be considered effective for capturing anthropophilic anophelines if its performance is comparable to that of HLC, not only in number of specimens captured, but also in the parity ratio of the females. In this current study, dissections of 10% of all *An. gambiae s.l.* and *An. funestus* specimens collected showed no difference in the proportions of parous females captured by BGM and HLC, corroborating the findings of Gama *et al.* in Brazil [20], who reported a similar physiological conditions in the sampled specimens. Besides demonstrating higher likelihood of being infected, monitoring parous females could be effective as a means of assessing the effectiveness of control interventions. Although not catching more mosquitoes than human attraction, the BGM trap was sufficiently comparable to HLC on the basis of the parity rates in both the two vector species assessed. In these experiments, both BGM and BGS also were capturing malaria vectors of same physiological state as human landing catches. All mosquitoes collected were unfed, and when dissected, we observed that the proportion of parous mosquitoes was consistently above 50% across all trap types, and that there was no difference between the traps.

The preference for feeding on humans displayed by anthropophilic mosquitoes has led to the development of odour blends for attracting these mosquitoes through a process of analysing the attractiveness of volatiles produced by humans [49–52]. The synthetic human odour developed at Ifakara Health Institute (Ifakara Blend) is an example of this type of blend, and it was demonstrated to be more attractive than humans at medium to long range [28]. In our findings, this blend was also highly attractive, although there were no statistical differences with the other lures tested for capturing *An. gambiae s.l.* All the synthetic blends tested in several studies were added with CO₂, a routine procedure to enhance mosquito responses [28, 36, 38, 53, 54]. Nevertheless, here the traps baited with CO₂ alone attracted similar numbers of *An. gambiae s.l.* as traps baited with the synthetic attractants evaluated. Since the role of the CO₂ in the attraction of host-seeking anophelines is well known [29, 55, 56], different sources, other than pressurized cylinders and dry ice, have been evaluated to use in traps to reduce the costs [31, 57, 58]. Yeast-fermented molasses, which has been demonstrated previously to be an effective and low-cost alternative source of CO₂ for odour-baited trapping systems of mosquitoes [31], was used in our experiments. Our results confirm these previous findings, showing that a trap baited with CO₂ originated from this mixture together with a synthetic lure can be effective.

In addition to having a good attractant, the success of odour-baited tools also is influenced by the selected odour-dispensing devices. In our experiments, the highest catches of *An. gambiae s.l.* were associated with the IB-treated microcapsules from Biogents Company encased in a plastic sachet. In other studies, nylon strips were the most effective matrix for dispensing synthetic attractants [32, 59]. However, the results demonstrated in this study shown that polymer materials such as the microcapsules on the sachets and plastic cartridge perform better than nylon strips for monitoring malaria mosquitoes. The same result was also reported in our semi-field study [22], where polymer materials were more effective for sampling *An. arabiensis* and also in a recent study conducted in Porto Velho, Brazil, with other polymer-based odour-dispensing devices (Batista *et al.*, unpublished). Elsewhere, Mweresa *et al.* [60] showed that alternative textile materials such as cotton and polyester could be more effective than nylon as a sustainable dispenser for synthetic attractants of host-seeking *Anopheles* mosquitoes. However, such devices do not allow control odour dispensation and are therefore short-lasting. Ideally, the odour dispensers should provide a constant and long-lasting efficacy in field sampling.

In our results, this trap is an effective tool for sampling mosquitoes. Nevertheless, there is need for a more refined attractant to yield representative vector samples as HLC. In our view, this remains priority if the new trap designs such as BGM and BGS are to be implemented widely. One other gap is that we did not test the devices for sampling indoor-biting vectors. Even though the residual malaria vectors increasingly bite outdoors, it is essential that a surveillance tool works properly in both indoor and outdoor settings. Additional studies in field settings are therefore recommended, both for validating and improving functionality of the BGM trap, but also for assessing its potential when used in intervention programs such as mass trapping [61] or in push-pull systems [62, 63].

Conclusion

We have described the BGM trap as a potential tool for field-sampling malaria vectors in Africa. The performance of this trap is vastly improved when used with an effective attractant, such as the Ifakara Blend, dispensed using an effective device such as polymer materials encased in the BG-Sachet. The physiological states of malaria vectors caught in BGM and BGS were similar to those naturally attempting to bite humans. However, both BGM and BGS predominantly caught more culicines than *Anopheles*, compared to HLC, which caught mostly *An. gambiae s.l.* Therefore, even though the trap have potential for field-sampling of African malaria vectors, the lack of representativeness of mosquito species diversity may limit its application as alternative for field-sampling of *Anopheles* mosquitoes.

Acknowledgments

We are grateful to the community in the villages in Ulanga and Kilombero district for their participation in the study. We thank all our Ifakara Health Institute colleagues for their support during the work. We would like to extend our sincere gratitude to Prof. George Corliss for his constructive comments and English revision of this manuscript. EPAB was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Grant 88881.133584/2016-01) and AEE funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI) (Grant 310205/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant PPM-00502-15). FOO was funded by a Wellcome Trust Intermediate Research Fellowship (Grant WT102350/Z/13/Z) and a Visiting Researcher Fellowship from CNPq/MCTI (Grant 42070/2013-2).

Author Contributions

Conceptualization: Elis P. A. Batista, Mercy Opiyo, Alvaro E. Eiras, Fredros O. Okumu.

Data curation: Elis P. A. Batista, Gasper K. Shubis, Felician C. Meza, Doreen J. Siria.

Formal analysis: Halfan Ngowo, Mercy Opiyo.

Funding acquisition: Alvaro E. Eiras, Fredros O. Okumu.

Investigation: Elis P. A. Batista.

Methodology: Elis P. A. Batista, Gasper K. Shubis, Felician C. Meza, Doreen J. Siria.

Project administration: Fredros O. Okumu.

Resources: Alvaro E. Eiras, Fredros O. Okumu.

Supervision: Elis P. A. Batista, Fredros O. Okumu.

Writing – original draft: Elis P. A. Batista, Mercy Opiyo, Doreen J. Siria.

Writing – review & editing: Elis P. A. Batista, Halfan Ngowo, Alvaro E. Eiras, Fredros O. Okumu.

References

1. WHO. World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization. 2017.
2. Bhatt S, Weiss D, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015; 526(7572):207–11. <https://doi.org/10.1038/nature15535> PMID: 26375008
3. WHO. A global brief on vector-borne diseases. Geneva: World Health Organization. 2014.
4. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta tropica*. 2017; 166:155–63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020> PMID: 27876643
5. Killeen GF, Seyoum A, Sikaala C, Zomboko AS, Gimnig JE, Govella NJ, et al. Eliminating malaria vectors. *Parasites & Vectors*. 2013; 6:172.
6. Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malaria Journal*. 2011; 10(80):80.
7. Bayoh MN, Mathias DK, Odiere MR, Mutuku FM, Kamau L, Gimnig JE, et al. *Anopheles gambiae*: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza Province, Kenya. *Malaria Journal*. 2010; 9(1):62.
8. Mwangangi JM, Mbogo CM, Orindi BO, Muturi EJ, Midega JT, Nzovu J, et al. Shifts in malaria vector species composition and transmission dynamics along the Kenyan coast over the past 20 years. *Malaria Journal*. 2013; 12(1):1–9.
9. Killeen GF, Marshall JM, Kiware SS, South AB, Tusting LS, Chaki PP, et al. Measuring, manipulating and exploiting behaviours of adult mosquitoes to optimise malaria vector control impact. *BMJ Global Health*. 2017; 2(2).
10. Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin A, Chandre F, et al. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *Journal of Infectious Diseases*. 2012; 206(10):1622–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis565> PMID: 22966127
11. Zhu L, Müller GC, Marshall JM, Arheart KL, Qualls WA, Hlaing WM, et al. Is outdoor vector control needed for malaria elimination? An individual-based modelling study. *Malaria Journal*. 2017; 16(1):266. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1920-y> PMID: 28673298
12. Lima JBP, Rosa-Freitas MG, Rodovalho CM, Santos F, Lourenço-de-Oliveira R. Is there an efficient trap or collection method for sampling *Anopheles darlingi* and other malaria vectors that can describe the essential parameters affecting transmission dynamics as effectively as human landing catches?—A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014; 109(5):685–705. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140134> PMID: 25185008

13. Maliti DV, Govella NJ, Killeen GF, Mirzai N, Johnson PC, Kreppel K, et al. Development and evaluation of mosquito-electrocuting traps as alternatives to the human landing catch technique for sampling host-seeking malaria vectors. *Malaria Journal*. 2015; 14(1):502.
14. Govella NJ, Maliti DF, Mlwale AT, Masallu JP, Mirzai N, Johnson PC, et al. An improved mosquito electrocuting trap that safely reproduces epidemiologically relevant metrics of mosquito human-feeding behaviours as determined by human landing catch. *Malaria Journal*. 2016; 15(1):465.
15. Matowo NS, Koekemoer LL, Moore SJ, Mmbando AS, Mapua SA, Coetzee M, et al. Combining Synthetic Human Odours and Low-Cost Electrocuting Grids to Attract and Kill Outdoor-Biting Mosquitoes: Field and Semi-Field Evaluation of an Improved Mosquito Landing Box. *PLoS One*. 2016; 11(1).
16. Kroeckel U, Rose A, Eiras ÁE, Geier M. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: Comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2006; 22(2):229–38. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[229:NTFSAJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[229:NTFSAJ]2.0.CO;2) PMID: 17019768
17. Schmied WH, Takken W, Killeen GF, Knols BG, Smallegange RC. Evaluation of two counterflow traps for testing behaviour-mediating compounds for the malaria vector *Anopheles gambiae* ss under semi-field conditions in Tanzania. *Malaria Journal*. 2008; 7(1):230.
18. Pombi M, Guelbeogo WM, Calzetta M, Sagnon NF, Petrarca V, La Gioia V, et al. Evaluation of a protocol for remote identification of mosquito vector species reveals BG-Sentinel trap as an efficient tool for *Anopheles gambiae* outdoor collection in Burkina Faso. *Malaria Journal*. 2015; 14(1):161.
19. Okal MN, Herrera-Varela M, Ouma P, Torto B, Lindsay SW, Lindh JM, et al. Analysing chemical attraction of gravid *Anopheles gambiae sensu stricto* with modified BG-Sentinel traps. *Parasites & Vectors*. 2015; 8(1):301.
20. Gama RA, Silva IMd, Geier M, Eiras ÁE. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013; 108(6):763–71. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013013> PMID: 24037199
21. Rodrigues MS, Silva IM, Leal LB, Dos Santos CA Jr, Eiras ÁE. Development of a New Mosquito Retention System for the BG-Malaria Trap To Reduce The Damage To Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2014; 30(3):184–90. <https://doi.org/10.2987/14-6423R.1> PMID: 25843093
22. Batista EP, Ngowo HS, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Okumu FO, et al. Semi-field assessment of the BG-Malaria trap for monitoring the African malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0186696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696> PMID: 29045484
23. Kaindoa EW, Mkandawile G, Ligamba G, Kelly-Hope LA, Okumu FO. Correlations between household occupancy and malaria vector biting risk in rural Tanzanian villages: implications for high-resolution spatial targeting of control interventions. *Malaria Journal*. 2016; 15(1):1.
24. Oketch F, Kotas M, Kihonda J, Killeen G, Moore S. Comparative evaluation of methods used for sampling malaria vectors in the Kilombero Valley, South Eastern Tanzania. *The Open Tropical Medicine Journal*. 2008; 1:51–5.
25. Okumu FO, Madumla EP, John AN, Lwetoijera DW, Sumaye RD. Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations-The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasites & Vectors*. 2010; 3:12.
26. Kaindoa EW, Matowo NS, Ngowo HS, Mkandawile G, Mmbando A, Finda M, et al. Interventions that effectively target *Anopheles funestus* mosquitoes could significantly improve control of persistent malaria transmission in south-eastern Tanzania. *PLoS One*. 2017; 12(5):e0177807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177807> PMID: 28542335
27. Mukabana WR, Mweresa CK, Otieno B, Omusula P, Smallegange RC, van Loon JJA, et al. A novel synthetic odorant blend for trapping of malaria and other African mosquito species. *Journal of Chemical Ecology*. 2012; 38(3):235–44. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0088-8> PMID: 22426893
28. Okumu FO, Killeen GF, Ogoma S, Biswaro L, Smallegange RC, Mbeyela E, et al. Development and field evaluation of a synthetic mosquito lure that is more attractive than humans. *PLoS One*. 2010; 5(1):e8951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008951> PMID: 20126628
29. Gillies M. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): A review. *Bulletin of Entomological Research*. 1980; 70(04):525–32.
30. Dekker T, Geier M, Cardé RT. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *Journal of Experimental Biology*. 2005; 208(15):2963–72.
31. Mweresa CK, Omusula P, Otieno B, Van Loon JJ, Takken W, Mukabana WR. Molasses as a source of carbon dioxide for attracting the malaria mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Malaria Journal*. 2014; 13:160. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-160> PMID: 24767543

32. Okumu F, Biswaro L, Mbeleyela E, Killeen G, Mukabana R, Moore S. Using nylon strips to dispense mosquito attractants for sampling the malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Journal of Medical Entomology*. 2010; 47(2):274–82. PMID: [20380310](#)
33. WHO. *Manual on Practical Entomology in Malaria—Methods and Techniques*. Geneva: World Health Organization. 1975.
34. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015, URL <http://www.R-project.org>. 2016.
35. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv preprint arXiv:14065823. 2014.
36. Busula AO, Takken W, Loy DE, Hahn BH, Mukabana WR, Verhulst NO. Mosquito host preferences affect their response to synthetic and natural odour blends. *Malaria Journal*. 2015; 14(1):133.
37. Gama RA, Silva IMd, Monteiro HAdO, Eiras ÁE. Fauna of Culicidae in rural areas of Porto Velho and the first record of *Mansonia (Mansonia) flaveola* (Coquillett, 1906), for the state of Rondônia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012; 45(1):125–7. PMID: [22370843](#)
38. Hoel DF, Marika JA, Dunford JC, Irish SR, Geier M, Obermayr U, et al. Optimizing Collection of *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) in Biogents Sentinel Traps. *Journal of Medical Entomology*. 2014; 51(6):1268–75. <https://doi.org/10.1603/ME14065> PMID: [26309317](#)
39. Verhulst NO, Bakker JW, Hiscox A. Modification of the Suna Trap for Improved Survival and Quality of Mosquitoes in Support of Epidemiological Studies. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2015; 31(3):223–32. <https://doi.org/10.2987/moco-31-03-223-232.1> PMID: [26375903](#)
40. Mendis C, Jacobsen J, Gamage-Mendis A, Bule E, Dgedge M, Thompson R, et al. *Anopheles arabiensis* and *An. funestus* are equally important vectors of malaria in Matola coastal suburb of Maputo, southern Mozambique. *Medical and Veterinary Entomology*. 2000; 14(2):171–80. PMID: [10872861](#)
41. Coetzee M, Craig M, Le Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*. 2000; 16(2):74–7. PMID: [10652493](#)
42. Russell TL, Lwetoijera DW, Maliti D, Chipwaza B, Kihonda J, Charlwood JD, et al. Research Impact of promoting longer-lasting insecticide treatment of bed nets upon malaria transmission in a rural Tanzanian setting with pre-existing high coverage of untreated nets. *Malaria Journal*. 2010; 9:187. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-187> PMID: [20579399](#)
43. Lwetoijera DW, Harris C, Kiware SS, Dongus S, Devine GJ, McCall PJ, et al. Increasing role of *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in malaria transmission in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malaria Journal*. 2014; 13:331. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-331> PMID: [25150840](#)
44. Tirados I CC, Gibson G, Torr S. Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito *Anopheles arabiensis*: implications for vector control. *Medical and Veterinary Entomology*. 2006; 20:425–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.652.x> PMID: [17199754](#)
45. Kelly-Hope LA MF. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-saharan Africa. *Malaria Journal*. 2009; 8(19).
46. Govella NJ, Chaki PP, Killeen GF. Entomological surveillance of behavioural resilience and resistance in residual malaria vector populations. *Malaria Journal*. 2013; 12(1):124.
47. Lima JB, Galardo AK, Bastos LS, da Silva Lima AW, Rosa-Freitas MG. MosqTent: An individual portable protective double-chamber mosquito trap for anthropophilic mosquitoes. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017; 11(3).
48. Mboera L. Sampling techniques for adult Afrotropical malaria vectors and their reliability in the estimation of entomological inoculation rate. *Tanzania Journal of Health Research*. 2006; 7(3):117–24.
49. Qiu Y, Smallegange R, Van Loon J, Ter Braak C, Takken W. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* ss. *Medical and Veterinary Entomology*. 2006; 20(3):280–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00627.x> PMID: [17044878](#)
50. Logan JG, Birkett MA, Clark SJ, Powers S, Seal NJ, Wadhams LJ, et al. Identification of human-derived volatile chemicals that interfere with attraction of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology*. 2008; 34(3):308–22. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9436-0> PMID: [18306972](#)
51. Verhulst NO, Mbadi PA, Kiss GB, Mukabana WR, van Loon JJ, Takken W, et al. Improvement of a synthetic lure for *Anopheles gambiae* using compounds produced by human skin microbiota. *Malaria Journal*. 2011; 10(1):1.
52. Mukabana WR, Mweresa CK, Otieno B, Omusula P, Smallegange RC, Van Loon JJ, et al. A novel synthetic odorant blend for trapping of malaria and other African mosquito species. *Journal of Chemical Ecology*. 2012; 38(3):235–44. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0088-8> PMID: [22426893](#)
53. Menger D, Van Loon J, Takken W. Assessing the efficacy of candidate mosquito repellents against the background of an attractive source that mimics a human host. *Medical and Veterinary Entomology*. 2014; 28(4):407–13. <https://doi.org/10.1111/mve.12061> PMID: [24797577](#)

54. Mmbando AS, Okumu FO, Mgando JP, Sumaye RD, Matowo NS, Madumla E, et al. Effects of a new outdoor mosquito control device, the Mosquito Landing Box, on densities and survival of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, inside controlled semi-field settings. *Malaria Journal*. 2015; 14(1):1.
55. Dekker T, Takken W. Differential responses of mosquito sibling species *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* to carbon dioxide, a man or a calf. *Medical and Veterinary Entomology*. 1998; 12(2):136–40. PMID: [9622366](#)
56. Spitzen J, Smallegange RC, Takken W. Effect of human odours and positioning of CO₂ release point on trap catches of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* in an olfactometer. *Physiological Entomology*. 2008; 33(2):116–22.
57. Saitoh Y, Hattori J, Chinone S, Nihei N, Tsuda Y, Kurahashi H, et al. Yeast-generated CO₂ as a convenient source of carbon dioxide for adult mosquito sampling. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2004; 20(3):261–4. PMID: [15532924](#)
58. Smallegange RC, Schmied WH, van Roey KJ, Verhulst NO, Spitzen J, Mukabana WR, et al. Sugar-fermenting yeast as an organic source of carbon dioxide to attract the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*. 2010; 9(1):292.
59. Mukabana WR, Mweresa CK, Omusula P, Orindi BO, Smallegange RC, van Loon JJ, et al. Evaluation of low density polyethylene and nylon for delivery of synthetic mosquito attractants. *Parasites & Vectors*. 2012; 5:202.
60. Mweresa CK, Mukabana WR, Omusula P, Otieno B, Gheysens T, Takken W, et al. Evaluation of textile substrates for dispensing synthetic attractants for malaria mosquitoes. *Parasite & Vectors*. 2014; 7:376.
61. Degener C, Eiras A, Azara T, Roque R, Rösner S, Codeço C, et al. Evaluation of the effectiveness of mass trapping with BG-sentinel traps for dengue vector control: a cluster randomized controlled trial in Manaus, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2014; 51(2):408–20. PMID: [24724291](#)
62. Obermayr U, Ruther J, Bernier UR, Rose A, Geier M. Evaluation of a push-pull approach for *Aedes aegypti* (L.) using a novel dispensing system for spatial repellents in the laboratory and in a semi-field environment. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0129878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129878> PMID: [26115365](#)
63. Salazar FV, Achee NL, Grieco JP, Prabaripai A, Eisen L, Shah P, et al. Evaluation of a peridomestic mosquito trap for integration into an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) push-pull control strategy. *Journal of Vector Ecology*. 2012; 37(1):8–19. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00195.x> PMID: [22548532](#)

RESEARCH ARTICLE

Videographic analysis of flight behaviours of host-seeking *Anopheles arabiensis* towards BG-Malaria trap

Elis P. A. Batista^{1,2}*, Salum A. Mapua^{2,3,4}, Halfan Ngowo^{2,5}, Nancy S. Matowo^{2,6,7}, Elizangela F. Melo¹, Kelly S. Paixão¹, Alvaro E. Eiras¹, Fredros O. Okumu^{2,5,8}

1 Laboratory of Innovation Technologies in Vector Control, Department of Parasitology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Environmental Health and Ecological Sciences Department, Ifakara Health Institute, Ifakara, Tanzania, **3** School of Life Sciences, University of Keele, Staffordshire, United Kingdom, **4** School of Environment and Life Sciences, University of Salford, Manchester, United Kingdom, **5** Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom, **6** University of Basel, Basel, Switzerland, **7** Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland, **8** School of Public Health, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Parktown, Republic of South Africa

* These authors contributed equally to this work.

* ebatista@ihi.or.tz



OPEN ACCESS

Citation: Batista EPA, Mapua SA, Ngowo H, Matowo NS, Melo EF, Paixão KS, et al. (2019) Videographic analysis of flight behaviours of host-seeking *Anopheles arabiensis* towards BG-Malaria trap. PLoS ONE 14(7): e0220563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220563>

Editor: John Vontas, University of Crete, GREECE

Received: April 17, 2019

Accepted: July 18, 2019

Published: July 31, 2019

Copyright: © 2019 Batista et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: This work was funded by Wellcome Trust Intermediate Fellowship in Public Health and Tropical Medicine grant awarded to FOO (Grant Number: WT102350/Z/13). EPAB was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Grant 88881.133584/2016-01). SAM was funded by Wellcome Trust Master's Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (Grant Number: 212633/Z/18/Z). AEE was funded by the Conselho Nacional de

Abstract

The BG-Malaria trap (BGM) is an adaptation of the well-known BG-Sentinel trap (BGS) with greater trapping efficiencies for anopheline and culicine mosquitoes. Its continued optimization requires greater understanding of mosquito flight behaviors near it. We used three high-resolution infrared cameras (68 frames/second) to track flight behaviors of laboratory-reared *Anopheles arabiensis* females in vicinity of the BGM in comparison with BGS. Additional comparisons were done for BGM at 20, 40 and 80cm heights, and for BGMs baited with Ifakara blend plus CO₂, CO₂ alone, or no bait. More mosquitoes were observed near BGM than BGS. Both BGMs installed 20cm above the floor and baited with CO₂ received more visits by host-seeking mosquitoes than the other BGMs evaluated in their respective experiments. Trap designs, height and attractants all influence mosquito activity in vicinity of the traps which can be readily visualized using infrared cameras to accelerate trap development and testing. The greater activity of host-seeking mosquitoes near BGM than BGS supports the proven superiority of BGM traps in field and semi-field settings.

Introduction

As the world confronts renewed challenges from mosquito-borne diseases such as Zika virus, yellow fever, malaria, filariasis and Chikungunya virus, mosquito surveillance is becoming increasingly important both at country and regional levels. Effective trapping systems are particularly important to support initiatives such as malaria elimination, which now require reliable surveillance systems as core-interventions [1]. So far, there is no method more effective for collecting anophelines than the human landing catch (HLC), which is not only

Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI) (Grant 310205/2014-0) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant PPM-00502-15).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

cumbersome, expensive and difficult to standardize, but also exposes the volunteer collectors to potentially infectious mosquito-borne pathogens. Recent advances such as the electric grid traps [2, 3], human-baited double net traps [4] and the MosqTent [5] address many of the HLC-related challenges but still require actual human collectors. Besides, the results can be affected by inherent differences in attractiveness of volunteers. To address this challenge, synthetic attractants mimicking human odors [6] can be used.

Examples of odour-baited traps previously used for malaria vectors include the Suna trap [7], the Ifakara odour-baited station [8], the MMX trap [9, 10], the mosquito landing box [11], the BG-sentinel (BGS) [12] and the BG-Malaria (BGM) [13]. The BGM trap is a promising adaptation of the BGS and has been demonstrated to effectively sampling malaria vectors *Anopheles darlingi* in Brazil [13, 14] and *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus* in Tanzania [15, 16]. Since initial conception [13], the BGM has been improved by adding new mosquito retention systems [14] and using new synthetic attractants [15, 16]. Further optimization of the BGM, however, requires greater understanding of mosquito flight behaviors near it, e.g., how they approach, how long they spend in the vicinity and how they enter the trap.

Knowledge of how mosquitoes approach and enter a trap allows the improvement of capture mechanisms. Video tracking systems provide a wide range of possibilities to examine mosquito flight behaviors around traps and therefore help in improve trapping efficiencies. For example, analyses of mosquito flight tracks showed different capture efficiencies among different traps [17] and change in trap orientation resulted in different flight patterns, followed by contrasting short-range attractiveness [18]. Knowing the mosquito flight dynamics in vicinities of traps can thus be exploited to achieve significant improvements in tools for vector surveillance. Here, we used infrared cameras and a video-tracking software to assess flight behaviours of laboratory-reared *Anopheles arabiensis* females in the vicinity of BGM and BGS traps. Data is used to elucidate how the mosquitoes approach the trap so as to improve trapping efficiencies of BGM.

Methods

Mosquitoes

Laboratory-reared *An. arabiensis* female mosquitoes were obtained from a colony maintained at Ifakara Health Institute since 2009. The mosquitoes larvae were fed with Tetramin fish food and reared under standard insectary conditions ($29\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ RH and 12:12h photoperiod). In a separate room with average temperatures of $\sim 27^\circ\text{C}$ and relative humidity of 70–90%, adult mosquitoes were kept in 30 x 30 x 30cm cages and fed with 10% sucrose solution daily. To propagate the colony, the adult female mosquitoes were fed also on bovine blood by a polytetrafluoroethylene-based membrane artificial feeding method [19], every two days. Mosquitoes used in the tests were those not previously blood-fed, were 3–8 days old, and had access to sugar only until 6h before experiments.

BG-Malaria and BG Sentinel traps

The BG-Malaria trap (BGM) is an adaptation of the widely-used BG-Sentinel trap (BGS) [13, 16]. Both traps are cylindrical and measure 35cm in diameter and 40cm in height, they have an electrical fan (14cm diameter and powered by a 12 volt battery), which produces airflow suction to capture mosquitoes approaching the traps [12, 13, 16]. The main difference between BGM and BGS is that BGM is hung upside down, 40cm above the ground, producing upward instead of downward airflow as produced by BGS (Fig 1). Both traps were used in the study.

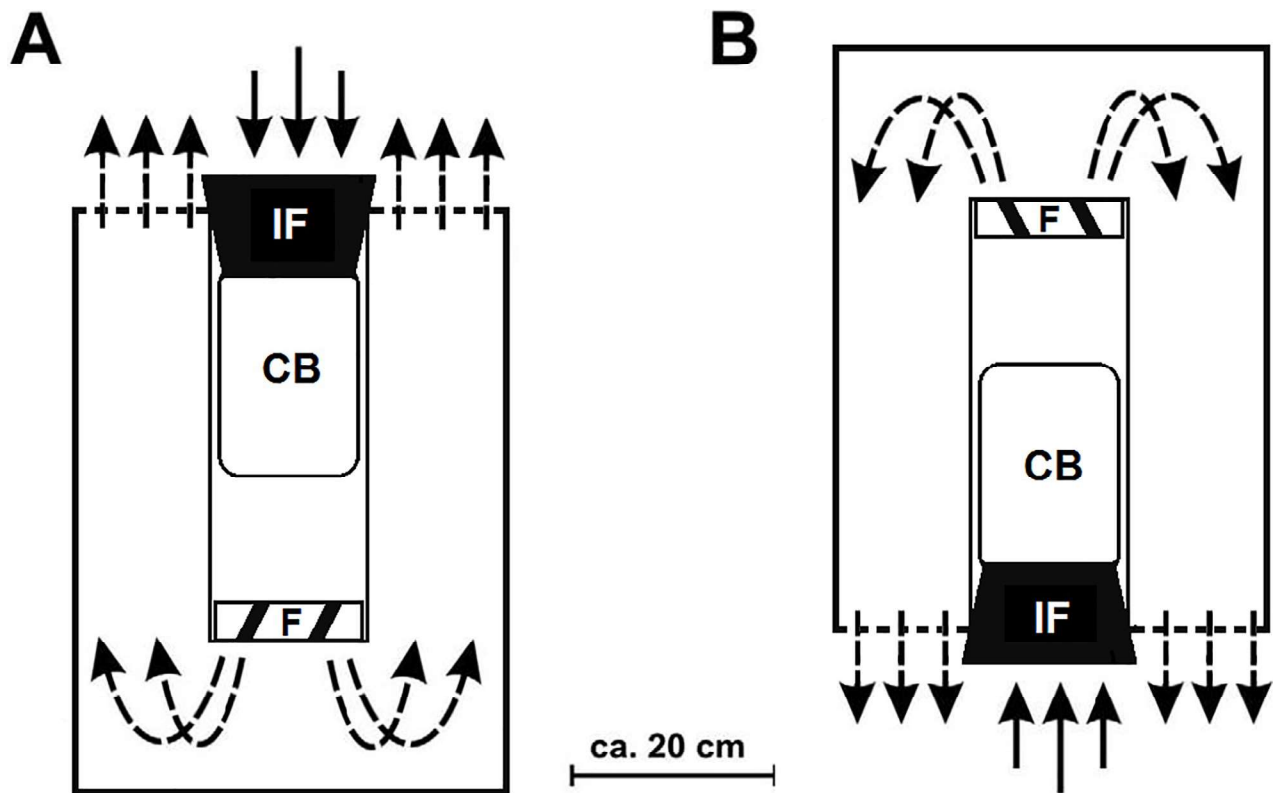


Fig 1. Illustration of the airflow direction (arrows) of the BG-Sentinel (A) and BG-Malaria (B) traps. IF = Intake funnel; CB = Catch Bag; F = Fan. Adapted from Batista et al., [16].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220563.g001>

Recording equipment and software

The work was conducted at the Ifakara Health Institute's Vector Laboratory (VectorSphere), located at Ifakara, Tanzania, using recording technology supplied by Noldus Information Technology, The Netherlands. The experiments were done inside a custom-built studio measuring 4m² in area and lined with dark fiberglass netting on walls and floor to reduce reflection to the infrared cameras. Three high resolution Basler monochrome GigE cameras (Basler acA1300 - 60gmNIR) with complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) sensors, coupled with three IR illuminators (Raytec RM25-120 Raymax 25 Infrared Illuminator—120–180° Beam, 26' Max IR Distance) with wavelength spectrum of 850 nm, were mounted on tripod stands (Velbon) inside the studio pointing at different angles to capture multiple images. The cameras were connected to a desktop computer in the control room, adjacent to the observation room, from where mosquito-responses could be observed. Mosquitoes were filmed using a Noldus Media Recorder (MR) 2.5, producing synchronous high-definition images from the cameras in MPEG-4 format.

The basic set-up of recording process is shown in Fig 2. The three infrared cameras were focused such that one camera produced the view of the white lid at the entrance of the traps (51cm x 36cm for BGS and 40cm x 36cm for BGM) (i.e., "entry point"), another viewed the lateral angles of the trap (36cm x 36cm) (i.e., "side"), and the third viewed the bottom of the trap (36cm diameter) (i.e., "top") (Fig 1). The "top" view was applicable only for BGM, which was hung firmly upside down at the center of the studio using a wooden support and the bottom of the trap is viewed as the top. Together, entry point, side and top constituted the filming arena. The cameras captured up to 68 frames per second.

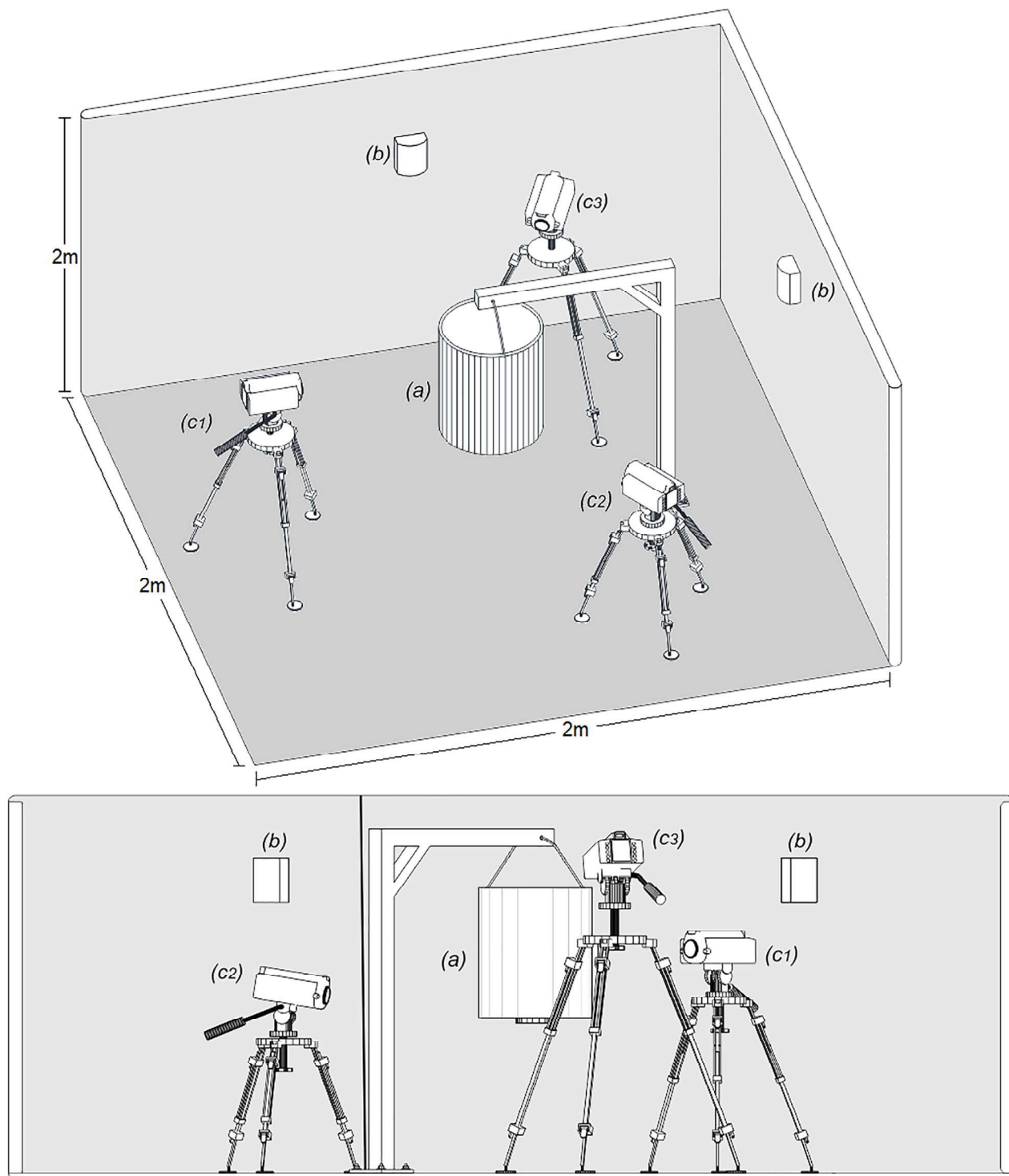


Fig 2. Experimental set-up in the video studio. The BG-Malaria trap (a) was installed in the center of the room, surrounded by Infrared illuminators (b) and three infrared video cameras (c1-3). The cameras were positioned to focus the lateral (c1), the entry point (c2) and the top (c3) of the trap. Observations on BG sentinel did not have top view.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220563.g002>

Study procedures

The study consisted of three experiments, conducted nightly with 50 mosquitoes, each recording session lasting 30 minutes after a 10-minute acclimatization period inside the observation room. The experiments were replicated four times in different days with different batches of mosquitoes. At the end of every filming round, all mosquitoes were removed from the experimental room using a Prokopack aspirator [20].

Observations of flight behavior of host-seeking *An. arabiensis* mosquitoes towards the baited BG-Sentinel and BG-Malaria traps. Mosquito behaviour was recorded in relation to an individual trap positioned at the center of the studio. Traps were baited with the synthetic human odour, i.e., Ifakara blend [6], supplemented with industrial CO₂ gas at a release rate of 500 ml/min. As the BGS lacked the top arena, the images for this experiment were only recorded for the entry point and sides of traps.

Assessing impact of installation height of BG-Malaria trap on flight behavior of host-seeking *An. arabiensis* mosquitoes. The BGM trap was positioned at the center of the studio, at heights of 20cm, 40cm and 80cm above the floor in different tests. In all tests, the trap was baited with the Ifakara blend plus CO₂.

Comparing flight behaviors of host-seeking *An. arabiensis* around BG-Malaria baited with different attractants. The BGM was tested when baited with either the Ifakara blend plus CO₂ or only CO₂. In addition, an unbaited BGM was tested as control. The setups were evaluated separately and in different days to minimize the contamination between setups.

Data analysis

The recorded footage was first processed using Ethovision XT 11.5 (Noldus Information Technology), to obtain heat maps and individual tracks of mosquitoes. The Ethovision software tracked up to 16 mosquitoes at a time per arena, but did not maintain individual identities of the mosquitoes throughout recording periods. The raw numeric data was then exported to R statistical software version 3.3.2 [21], for further analysis using Generalized Linear Mixed Models (GLMMs). The function *glmer* was used to fit the GLMMs under the package *lme4* (Bates *et al.*, 2015). Key parameters used to assess the responses of host-seeking mosquitoes towards BGS and BGM traps were: (1) velocity of the mosquito in the vicinity of the arena, (2) time spent in the vicinity of arena, (3) frequency of visits to the arena. Frequency of visits was modelled in Poisson distribution as a function of trap type as fixed effect, and replicate as random effect. On the other hand, time spent in the arena, and velocity of mosquitoes when visiting arena were modelled in Gamma distribution as a function of trap as fixed effect and replicate as random effect.

Ethical considerations

This study was approved by both Ifakara Health Institute IRB (IHI/IRB/No: 34–2014) and the Medical Research Coordinating Council at the Tanzania National Institute of Medical Research (Certificate No. NIMR/HQ/R.8a/Vol.IX/1903).

Results

Heat maps and track visualization

Mosquito flight paths were constructed from the recorded footage, except for when the mosquitoes flew out of the arena or flight velocities were exceedingly high. An example of a heat map and tracks is shown in Fig 3, showing different colors for places visited least (blue) to those visited the most (red) (Fig 3a–3c). The tracked path was visualized in red color and the

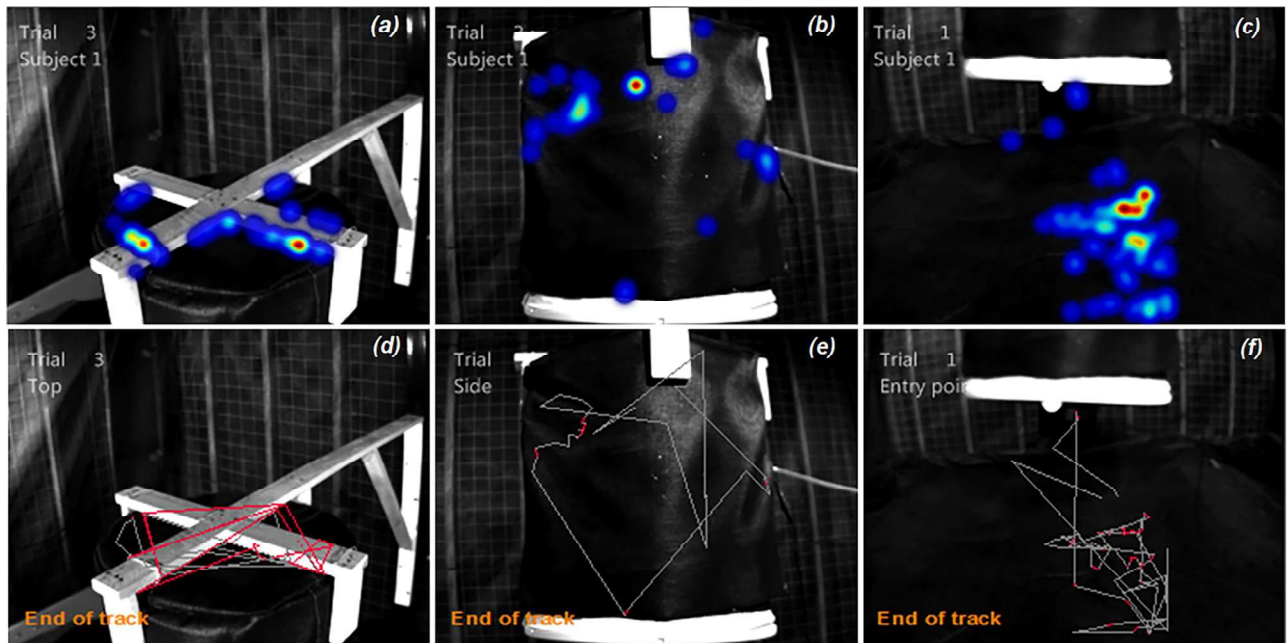


Fig 3. Heat maps and flight path of a single mosquito (Subject 1) around the top (a and d), lateral (b and e) and entrance (c and f) of the BG-Malaria trap baited with Ifakara blend plus CO₂ set at 40cm height. Each heat map and flight path shown was created as a result of the mosquito activities on each arena during the experiment period (30 minutes). Different colors on the panels (a) to (c) represent frequency of visits in different places, from blue (least visited) to red (most visited). The red lines on the panels (d) to (f) means the patch taken by mosquitoes around the trap, while the grey lines shows the non-tracked path of mosquitoes reconstructed by the software.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220563.g003>

non-tracked segments of the entire path, as reconstructed using the software model, was visualized in grey color (Fig 3d–3f).

Flight behavior of host-seeking *An. arabiensis* towards baited BG-Sentinel and BG-Malaria traps

Of the 400 mosquitoes released, 200 mosquitoes per trap separately, in the studio throughout the study period 45.5% ($n = 91$) and 53% ($n = 106$) of the mosquitoes visited the arenas (entry point and side) of the BGS and BGM traps, respectively. The frequency of mosquitoes visiting the entry point of the BGM was higher than in the BGS ($p < 0.001$). Comparing to the BGS, mosquitoes spent longer time on the entry point ($p < 0.001$) and side ($p < 0.001$) of the BGM. Moreover, flight velocity was higher when visiting both BGM entry point ($p < 0.001$) and BGM side ($p < 0.001$) compared to BGS (Table 1).

Flight behaviors of host-seeking *An. arabiensis* towards BG-Malaria traps set at different heights

The BGM was tested at three different heights (20cm, 40cm and 80cm above the floor), to evaluate flight behaviors of mosquitoes around it. BGM traps set at 20cm height received more visits from the mosquitoes at the entry point than traps set at 40 cm ($p < 0.001$) and 80 cm ($p < 0.001$). However, no difference was found between traps installed at 40cm and 80cm ($p = 0.670$). More visits were observed on the side of the 20 cm BGM traps compared to the 40 cm ($p < 0.05$) and 80 cm traps ($p < 0.001$). For the top view, more visits were observed on traps set at 80cm height compared to those at 20cm ($p < 0.001$) and 40cm ($p < 0.001$), but there was no difference between traps installed at 40cm and 20cm ($p = 0.133$) (Table 2).

Table 1. Frequency of visits, flight velocity and time spent by host-seeking *Anopheles arabiensis* females around each arena of the BG-Malaria trap relative to the BG-Sentinel trap.

Arena	Variable	Trap	Median [IQR]	RR [95%: LC, UC]	P value
Entry	Frequency (n)	BG-Sentinel	15.00 [11.00, 21.00]	1	<0.001
		BG-Malaria	61.00 [27.00, 76.00]	3.34 [3.05, 3.66]	
	Time (s)	BG-Sentinel	0.20 [0.19, 0.21]	1	<0.001
		BG-Malaria	0.30 [0.28, 0.32]	2.19 [1.54, 3.11]	
	Velocity (cm/s)	BG-Sentinel	2.14 [0.93, 5.07]	1	<0.001
		BG-Malaria	13.73 [11.44, 15.27]	2.93 [1.96, 4.39]	
Side	Frequency (n)	BG-Sentinel	4.00 [3.00, 6.00]	1	<0.001
		BG-Malaria	7.00 [4.00, 12.00]	1.92 [1.62, 2.25]	
	Time (s)	BG-Sentinel	0.21 [0.19, 0.37]	1	<0.001
		BG-Malaria	0.31 [0.25, 0.50]	12.41 [6.37, 24.18]	
	Velocity (cm/s)	BG-Sentinel	0.80 [0.53, 1.73]	1	<0.001
		BG-Malaria	7.60 [2.35, 21.24]	10.86 [6.48, 18.19]	

Entry = arena showing the entry point of the traps;

Side = arena showing the lateral of the traps.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220563.t001>

The mosquitoes spent more time at the entry point when the BGM was installed at 20 cm. However, this was only significantly different from the BGM installed at 80 cm ($p < 0.05$) but not at 40cm. When the arena observed was the side of the BGM, traps installed at 40cm had longer visits than that those at 80cm ($p < 0.001$) and 20cm ($p < 0.01$). Similarly, the mosquitoes stayed longer at 20cm than at 80cm installations ($p < 0.001$). In the last arena observed, i.e., the top of the trap, mosquitoes also spent longer near traps installed at 40cm compared to 20cm ($p < 0.001$) and 80cm ($p < 0.05$) (Table 2).

Mosquitoes flew with significantly lower velocity when visiting the entry point of BGM traps at 20cm compared to those set at 40cm ($p < 0.001$) and 80cm ($p < 0.001$). Significant differences were also observed between traps at 40cm and 80cm ($p < 0.05$). In observations of the side arena, mosquitoes flew with lower velocity when visiting traps set at 20cm and 80cm, compared to traps set at 40cm ($p < 0.001$). Observing the top of the BGM, the velocity of the mosquitoes was higher when the trap was set at 20 centimeters, compared to 40 ($p < 0.01$) or 80cm ($p < 0.001$) (Table 2).

Flight behavior of host-seeking *An. arabiensis* towards BG-Malaria trap baited with different attractants

The frequency with which mosquitoes flew near the entry points, on the sides and at the top of BGM trap was influenced significantly by the type of attractant used (Table 3). More mosquitoes visited the entry point when the BGM was baited with only CO₂ ($p < 0.001$) or Ifakara blend plus CO₂ ($p < 0.001$) than when the BGM was not baited. Significant differences were observed between the different baits (Ifakara blend plus CO₂ or CO₂ alone) ($p < 0.001$). When observing trap sides, fewer mosquitoes visited the unbaited BGM than BGM baited with Ifakara blend plus CO₂ ($p < 0.001$). The BGM baited with the Ifakara blend plus CO₂ also received more visits on the top, than the unbaited control ($p < 0.001$) and BGM baited with just CO₂ alone ($p < 0.001$) (Table 3).

Significant differences in the time spent on the entry point was observed, with less time spent in the CO₂-baited BGM than in the unbaited BGM ($p < 0.001$) (Table 3). In comparison

Table 2. Frequency of visits, flight velocity and time spent by host-seeking *Anopheles arabiensis* females around the arenas of the BG-Malaria trap installed at 40cm and 80cm heights relative to 20cm height.

Arena	Variable	Treatment	Median [IQR]	RR [95%: LC, UC]	P value
Entry	Frequency (n)	20 cm	161.0 [91.0, 237.0]	1	
		40 cm	61.0 [27.0, 76.0]	0.25 [0.24, 0.27]	<0.001
		80 cm	49.0 [26.0, 69.0]	0.23 [0.22, 0.24]	<0.001
	Time (s)	20 cm	0.32 [0.25, 0.34]	1	
		40 cm	0.31 [0.28, 0.32]	1.18 [0.83, 1.69]	0.347
		80 cm	0.09 [0.08, 0.10]	0.23 [0.16, 0.31]	<0.001
	Velocity (cm/s)	20 cm	1.52 [1.42, 2.53]	1	
		40 cm	13.73 [11.44, 15.27]	3.89 [2.68, 5.65]	<0.001
		80 cm	15.82 [8.54, 28.67]	7.66 [5.34, 11.00]	<0.001
Side	Frequency (n)	20 cm	13.00 [5.00, 17.75]	1	
		40 cm	7.00 [4.00, 12.00]	0.59 [0.52, 0.66]	<0.001
		80 cm	7.00 [4.00, 12.00]	0.56 [0.49, 0.64]	<0.001
	Time (s)	20 cm	0.21 [0.14, 3.61]	1	
		40 cm	0.32 [0.25, 0.52]	2.75 [1.34, 5.64]	<0.01
		80 cm	0.09 [0.08, 0.11]	0.03 [0.01, 0.06]	<0.001
	Velocity (cm/s)	20 cm	1.81 [1.42, 5.20]	1	
		40 cm	7.62 [2.35, 21.24]	3.52 [2.08, 5.95]	<0.001
		80 cm	1.67 [1.38, 2.54]	1.42 [0.81, 2.51]	0.220
Top	Frequency (n)	20 cm	12.00 [6.50, 15.25]	1	
		40 cm	8.00 [5.00, 12.00]	0.91 [0.81, 1.03]	0.133
		80 cm	45.00 [15.50, 70.50]	4.23 [3.87, 4.63]	<0.001
	Time (s)	20 cm	0.31 [0.23, 0.42]	1	
		40 cm	0.31 [0.26, 0.63]	7.35 [3.83, 14.08]	<0.001
		80 cm	0.08 [0.08, 0.09]	0.05 [0.02, 0.11]	<0.001
	Velocity (cm/s)	20 cm	20.72 [2.18, 68.57]	1	
		40 cm	7.62 [2.34, 21.24]	0.46 [0.28, 0.77]	<0.01
		80 cm	8.54 [2.53, 14.31]	0.30 [0.17, 0.54]	<0.001

Entry = arena showing the entry point of the trap;

Side = arena showing the lateral of the trap;

Top = arena showing the base of the trap.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220563.t002>

with the unbaited trap, mosquitoes spent less time on sides of BGM baited with Ifakara blend plus CO₂ (p < 0.001). At the top of the trap however, no significant difference was found between all the treatments evaluated in time spent by mosquitoes (Table 3). Higher velocity was observed when mosquitoes visited the entry point of the BGM baited with only CO₂ (p < 0.001) or Ifakara blend plus CO₂ (p < 0.001) compared to unbaited control. Similar findings were observed in the side of the traps. Lastly, mosquitoes flew faster at the top of BGMs baited using Ifakara blend plus CO₂, compared to the control (p < 0.05) (Table 3).

Discussion

The need for exposure free methods to sample mosquitoes that can be as sensitive as human volunteer catchers is increasingly important. This is particularly urgent as countries seek to integrate effective surveillance programs as core-interventions in line with global policies

Table 3. Frequency of visits, flight velocity and time spent by host-seeking *Anopheles arabiensis* females around the arenas of the BG-Malaria trap baited with different lures relative to control (unbaited trap).

Arena	Variable	Treatment	Median [IQR]	RR [95%: LC, UC]	P value
Entry	Frequency (n)	Control	7.00 [4.00, 11.00]	1	
		CO ₂	65.0 [44.0, 125.0]	9.83 [8.70, 11.13]	<0.001
		IB + CO ₂	61.0 [27.0, 76.0]	6.71 [5.92, 7.60]	<0.001
	Time (s)	Control	0.42 [0.27, 2.07]	1	
		CO ₂	0.39 [0.35, 0.44]	0.03 [0.01, 0.05]	<0.001
		IB + CO ₂	0.30 [0.28, 0.32]	0.05 [0.02, 0.10]	<0.001
	Velocity (cm/s)	Control	2.05 [0.70, 5.91]	1	
		CO ₂	12.75 [9.58, 15.24]	4.86 [2.89, 8.16]	<0.001
		IB + CO ₂	13.73 [11.44, 15.27]	2.64 [1.64, 4.24]	<0.001
Side	Frequency (n)	Control	3.00 [1.00, 7.00]	1	
		CO ₂	3.00 [2.00, 5.00]	0.96 [0.75, 1.24]	0.774
		IB + CO ₂	7.00 [4.00, 12.00]	2.02 [1.60, 2.54]	<0.001
	Time (s)	Control	1.18 [0.49, 2.84]	1	
		CO ₂	0.26 [0.21, 0.43]	0.59 [0.18, 1.94]	0.388
		IB + CO ₂	0.32 [0.25, 0.52]	0.06 [0.02, 0.17]	<0.001
	Velocity (cm/s)	Control	0.64 [0.21, 1.47]	1	
		CO ₂	5.97 [0.37, 24.68]	33.41 [15.43, 72.34]	<0.001
		IB + CO ₂	7.62 [2.35, 21.24]	24.67 [11.72, 51.94]	<0.001
Top	Frequency (n)	Control	4.00 [2.00, 9.00]	1	
		CO ₂	8.00 [6.00, 12.00]	1.25 [1.06, 1.48]	<0.01
		IB + CO ₂	10.00 [7.75, 17.50]	2.14 [1.88, 2.44]	<0.001
	Time (s)	Control	0.43 [0.29, 12.64]	1	
		CO ₂	0.44 [0.28, 15.69]	0.49 [0.19, 1.29]	0.147
		IB + CO ₂	0.57 [0.35, 1.82]	0.49 [0.22, 1.08]	0.077
	Velocity (cm/s)	Control	2.76 [0.89, 16.96]	1	
		CO ₂	5.40 [0.77, 23.52]	0.87 [0.45, 1.67]	0.669
		IB + CO ₂	14.37 [2.74, 38.44]	1.75 [1.06, 2.90]	<0.05

Entry refers to the arena showing the entry point of the trap;

Side refers to the arena showing the lateral side of the trap;

Top refers to the arena showing the base of the trap;

CO₂ = Trap baited with only CO₂;

IB + CO₂ = Trap baited with Ifakara blend plus CO₂;

Control = unbaited trap.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220563.t003>

[1]. Odour-baited traps are frequently used for vector surveillance and can constitute alternative tools for such surveillance on a large scale. The development of the BGM was through simple adaptation of commonly used BG-Sentinel trap (BGS), with the main difference being the upside down installation of the former, to provide inverted airflow orientation [13, 16]. When first tested, performance of BGM trap for sampling Brazilian malaria vectors in field tests was as good as the HLC [13]. To assess suitability in multiple sites, the BGM was then also evaluated in semi-field [16] and field conditions in Tanzania [15], to validate its performance as an efficient and safer method for collecting anophelines that can potentially replace the HLC. In both cases, the trap demonstrated good performance in terms of species

diversities and physiological stages of the mosquitoes collected, even though the actual numbers did not match HLC, and the performance depended on the type of lure used [15]. This current study was designed to complement those earlier studies in Tanzania, and involved a series of experiments to assess how mosquitoes approach and enter the trap, and how long they stay in the vicinity of the trap when set at different heights or baited with different attractants. The videographic observations therefore also enabled demonstration of feasibility of such an approach for high-throughput evaluation and improvement of traps during development.

The findings of this video tracking largely match those observed in the field and semi-field tests. For example, Batista *et al.* [16] reported that twice as many *An. arabiensis* females were caught by the BGM than by the BGS in semi-field trials and the results presented here also show that more mosquitoes flew around the vicinities of the BGM than in the BGS. The frequency of mosquitoes flying, and the time they spent in the trap vicinity were also higher for BGM than in BGS. Different flight dynamics of mosquitoes observed around identical traps deployed in two opposite ways have been previously described by Cribellier *et al.* [18], where these authors observed that mosquitoes flying downwards near the traps turned to fly upwards resulting in increased likelihood of capture by hanging traps, and higher likelihood of escape from standing traps. Such flight behaviour towards the hanging trap was consistent with our present findings, where mosquitoes approaching in downward flight then flew upwards around the BGM entry point.

A potentially important finding was that velocity in flight of mosquitoes around the BGM was higher than in the arenas of the BGS and that these velocities were highest at the entry point. When turning to fly upward, mosquitoes tend to accelerate their flight to perform upward-directed manoeuvres [18, 22]. On the other hand, as the trap entrance is the area with the highest air volume and speed due to the airflow produced by the trap fan, it is possible that this high suction airspeed directly influenced the flight velocity and the likelihood of mosquitoes being sucked into the trap. Since inverting the airflow in the BGM extends the area of high-speed flow more than 17 times [18], this may cause an increase in observed flight velocity.

This downward/upward flight dynamic was previously described in anthropophilic host-seeking *Anopheles* mosquitoes, which were guided by the host odour to land on the body parts that were closest to the ground [23]. After detecting an odour cue in a wind tunnel, *Aedes aegypti* mosquitoes spent most of the time flying near the ground to explore a visual object [24]. Our results showed a similar behaviour, as mosquitoes visited the BGM installed 20cm above the ground more than the traps positioned at greater heights. Mosquitoes also spent longer in the arenas of the lower set traps, i.e., with the entrance at 20cm and 40cm above the ground, and the time spent by mosquitoes in the entry point and side of the traps in both heights was not different from each other. Schmied *et al.* [25] also used the BGS to collect *Anopheles* and caught more mosquitoes than in an upward flow trap. Although the air current was downward, the BGS was installed below ground level, which may have affected its effectiveness as this original configuration in the present study received less visits by the mosquitoes compared with the BGM, which are an upside-down variant of the BGS. These findings indicate that mosquitoes most likely fly close to the ground, which in combination with the human odours present on the feet and convective air currents may account for the tendency of *Anopheles* to bite on the low on the host. Furthermore, the average velocity at which mosquitoes flew near the entry point of the BGMs decreased as the traps were set lower down. This result was consistent with the study of Cooperband & Carde [17], which reported that mosquitoes decelerated their flight when approaching the trap, adopting a sinuous flight, similar to the flight track demonstrated in the Fig 3e and 3f.

Through the combination of various host cues, such as odour, CO₂ and visual features, odour-baited traps target the female mosquitoes in the host-seeking stage. The BGM has a black and white colour pattern and was originally conceived to use CO₂ as bait [13]. As part of the BGM continuous optimization, other attractants like synthetic human odour were also evaluated in semi-field and field conditions, with the finding that CO₂-baited traps caught similar numbers of *An. arabiensis* as traps baited with synthetic attractants [15, 16]. In this current study, more mosquitoes were attracted to the entry point of the CO₂-baited BGM than the BGM baited with the synthetic attractant Ifakara blend plus CO₂. The function of CO₂ as an attractant for host-seeking mosquitoes has been amply described [26–28], and CO₂ is considered an important flight activator when mosquitoes need to find a host [29–32]. Female mosquitoes can detect small changes in CO₂ concentration in the air, using their sensory system [26, 33–35]. Dekker et al. [36] reported that in a wind-tunnel assay mosquitoes were induced to fly upwind by increasing the ambient concentration of CO₂ by 0.5%. However, CO₂ triggers a poor response in the attraction of highly anthropophilic mosquitoes [30, 37], which use a species-specific combination of human odours and CO₂ [38–43]. *An. arabiensis* is an opportunistic species that feeds on both humans and animals [44, 45] and such opportunistic/zoophilic species respond well to breath [46, 47], which contains approximately 5% CO₂. These previous findings about the role of CO₂ in mosquitoes host-seeking behaviour are consistent with our results that displayed a greater attraction of *An. arabiensis* females to both baited BGMs over control (unbaited BGM).

Trap designs, height and attractants all influence mosquito activity in vicinity of the traps. Moreover, this activity can be readily visualized using infrared cameras to accelerate trap development and testing. One limitation of the present study was in the continuous tracking of mosquito flight paths, which was particularly challenging due to the high flight velocities in practice. Nonetheless, the software that we employed was able to reconstruct, and allow the visualization of, the non-tracked segments by mathematic modeling (e.g., Fig 3c–3f).

Conclusion

Knowledge of vector flight behavior is of great importance to develop new tools that can successfully contribute to the fight against vector-borne disease. Since the conception of the BGM by adapting the BG-Sentinel trap, studies have been conducted to increase the trapping efficiency [14, 16]. In our study, the greater activity of host-seeking mosquitoes near BGM than BGS traps supports the proven superiority of BGM traps in field and semi-field settings. Moreover, the results we present here provide new insights into the capture mechanism of the BGM trap and will inform future improvement of this trap to the point where it can successfully replace the HLC.

Acknowledgments

We thank Mr. Joseph Mgando, who helped to take care of the laboratory-reared mosquitoes during the entire study period and we are also grateful to all our Ifakara Health Institute and Federal University of Minas Gerais colleagues for their support during the work. We would like to extend our sincere gratitude to Mr. Saulo Silvestre de Castro for his wonderful work creating the experimental design figure and Ms. Marceline Finda for the critical and constructive review. We are also grateful to Prof. Joseph A. Jackson for his constructive comments and English revision of this manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Elis P. A. Batista, Alvaro E. Eiras, Fredros O. Okumu.

Data curation: Salum A. Mapua.

Formal analysis: Salum A. Mapua, Halfan Ngowo.

Funding acquisition: Nancy S. Matowo, Fredros O. Okumu.

Investigation: Elis P. A. Batista, Salum A. Mapua, Elizangela F. Melo.

Methodology: Salum A. Mapua, Elizangela F. Melo.

Supervision: Elis P. A. Batista, Salum A. Mapua.

Writing – original draft: Elis P. A. Batista, Salum A. Mapua.

Writing – review & editing: Elis P. A. Batista, Halfan Ngowo, Kelly S. Paixão, Alvaro E. Eiras, Fredros O. Okumu.

References

1. Organization WH. Global technical strategy for malaria 2016–2030: World Health Organization; 2015.
2. Govella NJ, Maliti DF, Mwale AT, Masallu JP, Mirzai N, Johnson PC, et al. An improved mosquito electrocuting trap that safely reproduces epidemiologically relevant metrics of mosquito human-feeding behaviours as determined by human landing catch. *Malaria journal*. 2016; 15(1):465.
3. Maliti DV, Govella NJ, Killeen GF, Mirzai N, Johnson PC, Kreppel K, et al. Development and evaluation of mosquito-electrocuting traps as alternatives to the human landing catch technique for sampling host-seeking malaria vectors. *Malaria journal*. 2015; 14(1):502.
4. Tangena J-AA, Thammavong P, Hiscox A, Lindsay SW, Brey PT. The human-baited double net trap: an alternative to human landing catches for collecting outdoor biting mosquitoes in Lao PDR. *PLoS One*. 2015; 10(9):e0138735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138735> PMID: 26381896
5. Lima JBP, Galardo AKR, Bastos LS, da Silva Lima AW, Rosa-Freitas MG. MosqTent: An individual portable protective double-chamber mosquito trap for anthropophilic mosquitoes. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017; 11(3):e0005245. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005245> PMID: 28278171
6. Okumu FO, Killeen GF, Ogoma S, Bisworo L, Smallegange RC, Mbeyela E, et al. Development and field evaluation of a synthetic mosquito lure that is more attractive than humans. *PLoS One*. 2010; 5(1):e8951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008951> PMID: 20126628
7. Hiscox A, Otieno B, Kibet A, Mweresa CK, Omusula P, Geier M, et al. Development and optimization of the Suna trap as a tool for mosquito monitoring and control. *Malaria journal*. 2014; 13(1):257.
8. Okumu FO, Madumla EP, John AN, Lwetoijera DW, Sumaye RD. Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations-The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasit Vectors*. 2010; 3:12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-12> PMID: 20193085
9. Kline DL. Comparison of two American biophysics mosquito traps: The professional and a new counter-flow geometry trap. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*. 1999; 15(3):276–82.
10. Kline DL. Evaluation of various models of propane-powered mosquito traps. *Journal of Vector Ecology*. 2002; 27:1–7. PMID: 12125861
11. Matowo NS, Moore J, Mapua S, Madumla EP, Moshi IR, Kaindo EW, et al. Using a new odour-baited device to explore options for luring and killing outdoor-biting malaria vectors: A report on design and field evaluation of the Mosquito Landing Box. *Parasites & Vectors*. 2013; 6:137.
12. Kroeckel U, Rose A, Eiras AE, Geier M. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: Comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2006; 22(2):229–38. PMID: 17019768
13. Gama RA, Silva IMd, Geier M, Eiras AE. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013; 108(6):763–71. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013013> PMID: 24037199
14. Rodrigues MS, Silva IM, Leal LB, Dos Santos CA Jr, Eiras AE. Development of a New Mosquito Retention System for the BG-Malaria Trap To Reduce The Damage To Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2014; 30(3):184–90. <https://doi.org/10.2987/14-6423R.1> PMID: 25843093
15. Batista EP, Ngowo H, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Siria DJ, et al. Field evaluation of the BG-Malaria trap for monitoring malaria vectors in rural Tanzanian villages. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0205358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205358> PMID: 30296287

16. Batista EP, Ngowo HS, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Okumu FO, et al. Semi-field assessment of the BG-Malaria trap for monitoring the African malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0186696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186696> PMID: 29045484
17. Cooperband M, Cardé R. Orientation of *Culex* mosquitoes to carbon dioxide-baited traps: flight manoeuvres and trapping efficiency. *Medical and veterinary entomology*. 2006; 20(1):11–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00613.x> PMID: 16608486
18. Cribellier A, van Erp JA, Hiscox A, Lankheet MJ, van Leeuwen JL, Spitzen J, et al. Flight behaviour of malaria mosquitoes around odour-baited traps: capture and escape dynamics. *Royal Society Open Science*. 2018; 5(8):180246. <https://doi.org/10.1098/rsos.180246> PMID: 30225014
19. Siria DJ, Batista EP, Opiyo MA, Melo EF, Sumaye RD, Ngowo HS, et al. Evaluation of a simple polytetrafluoroethylene (PTFE)-based membrane for blood-feeding of malaria and dengue fever vectors in the laboratory. *Parasites & vectors*. 2018; 11(1):236.
20. Maia MF, Robinson A, John A, Mgando J, Simfukwe E, Moore SJ. Comparison of the CDC Backpack aspirator and the Prokopack aspirator for sampling indoor-and outdoor-resting mosquitoes in southern Tanzania. *Parasites & vectors*. 2011; 4(1):124.
21. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015, URL <http://www.R-project.org>. 2016.
22. Hawkes F, Gibson G. Seeing is believing: the nocturnal malaria mosquito *Anopheles coluzzii* responds to visual host-cues when odour indicates a host is nearby. *Parasites & vectors*. 2016; 9(1):320.
23. Dekker T, Takken W, Knols BG, Bouman E, van de Laak S, de Bever A, et al. Selection of biting sites on a human host by *Anopheles gambiae* ss, *An. arabiensis* and *An. quadriannulatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1998; 87(3):295–300.
24. Van Breugel F, Riffell J, Fairhall A, Dickinson MH. Mosquitoes use vision to associate odor plumes with thermal targets. *Current Biology*. 2015; 25(16):2123–9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.046> PMID: 26190071
25. Schmied WH, Takken W, Killeen GF, Knols BG, Smallegange RC. Evaluation of two counterflow traps for testing behaviour-mediating compounds for the malaria vector *Anopheles gambiae* ss under semi-field conditions in Tanzania. *Malaria Journal*. 2008; 7(1):230.
26. Gillies M. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): A review. *Bulletin of Entomological Research*. 1980; 70(04):525–32.
27. Dekker T, TAKKEN W. Differential responses of mosquito sibling species *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* to carbon dioxide, a man or a calf. *Medical and veterinary entomology*. 1998; 12(2):136–40. PMID: 9622366
28. Spitzen J, Smallegange RC, Takken W. Effect of human odours and positioning of CO₂ release point on trap catches of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto in an olfactometer. *Physiological Entomology*. 2008; 33(2):116–22.
29. Reeves W. Quantitative Field Studies on a Carbon Dioxide Chemotropism of Mosquitoes¹. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1953; 2(2):325–31. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1953.2.325> PMID: 13040669
30. Mboera L, Takken W. Carbon dioxide chemotropism in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and its potential in vector surveillance and management programmes. *Medical and veterinary entomology*. 1997; 7:355–68.
31. Lacey E, Cardé R. Activation, orientation and landing of female *Culex quinquefasciatus* in response to carbon dioxide and odour from human feet: 3-D flight analysis in a wind tunnel. *Medical and veterinary entomology*. 2011; 25(1):94–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00921.x> PMID: 21118282
32. EIRAS A. Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos vetores de doenças médico-veterinárias. In: V EF, TMC DL, editors. *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. Ribeirão Preto: Holos; 2001. p. 206.
33. EIRAS A, JEPSON P, editors. The behavior responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to carbon dioxide plumes. *Techniques in Plant-Insect Interactions and Biopescides Santiago: Proceedings of an IFS Workshop in Chemical Ecology*; 1996.
34. Healy T, Copland M. Activation of *Anopheles gambiae* mosquitoes by carbon dioxide and human breath. *Medical and veterinary entomology*. 1995; 9(3):331–6. PMID: 7548953
35. Grant AJ, O'Connell RJ. Electrophysiological responses from receptor neurons in mosquito maxillary palp sensilla. *Olfaction in mosquito-host interactions*. 1996; 200:233–53.
36. Dekker T, Geier M, Cardé RT. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *Journal of Experimental Biology*. 2005; 208(15):2963–72.
37. Takken W, Dekker T, Wijnholds Y. Odor-mediated flight behavior of *Anopheles gambiae* giles Sensu Stricto and *An. stephensi* liston in response to CO₂, acetone, and 1-octen-3-ol (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Behavior*. 1997; 10(3):395–407.


38. Cooper R, Frances S, Popat S, Waterson D. The effectiveness of light, 1-octen-3-ol, and carbon dioxide as attractants for anopheline mosquitoes in Madang Province, Papua New Guinea. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2004; 20(3):239–42. PMID: [15532920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15532920/)
39. Qiu YT, Smallegange RC, Braak CJ, Spitzen J, Van Loon JJ, Jawara M, et al. Attractiveness of MM-X traps baited with human or synthetic odor to mosquitoes (Diptera: Culicidae) in The Gambia. *Journal of medical entomology*. 2007; 44(6):970–83. PMID: [18047195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18047195/)
40. Hiwat H, De Rijk M, Andriessen R, Koenraadt C, Takken W. Evaluation of methods for sampling the malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae) in Suriname and the relation with its biting behavior. *Journal of medical entomology*. 2011; 48(5):1039–46. <https://doi.org/10.1603/me10245> PMID: [21936323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21936323/)
41. Smallegange RC, Qiu YT, van Loon JJ, Takken W. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Chemical senses*. 2005; 30(2):145–52. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji010> PMID: [15703334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15703334/)
42. Smallegange RC, Qiu YT, Bukovinszkiné-Kiss G, Van Loon JJ, Takken W. The effect of aliphatic carboxylic acids on olfaction-based host-seeking of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Journal of chemical ecology*. 2009; 35(8):933. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9668-7> PMID: [19626371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19626371/)
43. Jawara M, Awolola TS, Pinder M, Jeffries D, Smallegange RC, Takken W, et al. Field testing of different chemical combinations as odour baits for trapping wild mosquitoes in The Gambia. *PLoS One*. 2011; 6(5):e19676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019676> PMID: [21637337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637337/)
44. Kitau J, Oxborough RM, Tungu PK, Matowo J, Malima RC, Magesa SM, et al. Species shifts in the *Anopheles gambiae* complex: do LLINs successfully control *Anopheles arabiensis*? *PLoS One*. 2012; 7(3):e31481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031481> PMID: [22438864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22438864/)
45. Lwetoijera DW, Harris C, Kiware SS, Dongus S, Devine GJ, McCall PJ, et al. Increasing role of *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in malaria transmission in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malaria journal*. 2014; 13(1):331.
46. Laarman JJ. The Host-Seeking Behaviour of the Malaria Mosquito *Anopheles maoulipennis atroparvus*. The Host-Seeking Behaviour of the Malaria Mosquito *Anopheles maoulipennis atroparvus*. 1955.
47. Wilton DP. Mosquito collections in El Salvador with ultra-violet and CDC miniature light traps with and without dry ice [Insects, carbon dioxide]. *Mosquito News*. 1975.

RESEARCH

Open Access



Evaluation of a push–pull system consisting of transfluthrin-treated eave ribbons and odour-baited traps for control of indoor- and outdoor-biting malaria vectors

Arnold S. Mmbando^{1*} , Elis P. A. Batista², Masoud Kilalangongono¹, Marceline F. Finda^{1,3}, Emmanuel P. Mwangi¹, Emmanuel W. Kaindo^{1,3}, Khamis Kifungo¹, Rukiyah M. Njalambaha¹, Halfan S. Ngowo^{1,4}, Alvaro E. Eiras² and Fredros O. Okumu^{1,3,4}

Abstract

Background: Push–pull strategies have been proposed as options to complement primary malaria prevention tools, indoor residual spraying (IRS) and long-lasting insecticide-treated nets (LLINs), by targeting particularly early-night biting and outdoor-biting mosquitoes. This study evaluated different configurations of a push–pull system consisting of spatial repellents [transfluthrin-treated eave ribbons (0.25 g/m² ai)] and odour-baited traps (CO₂-baited BG-Malaria traps), against indoor-biting and outdoor-biting malaria vectors inside large semi-field systems.

Methods: Two experimental huts were used to evaluate protective efficacy of the spatial repellents (push-only), traps (pull-only) or their combinations (push–pull), relative to controls. Adult volunteers sat outdoors (1830 h–2200 h) catching mosquitoes attempting to bite them (outdoor-biting risk), and then went indoors (2200 h–0630 h) to sleep under bed nets beside which CDC-light traps caught host-seeking mosquitoes (indoor-biting risk). Number of traps and their distance from huts were varied to optimize protection, and 500 laboratory-reared *Anopheles arabiensis* released nightly inside the semi-field chambers over 122 experimentation nights.

Results: Push–pull offered higher protection than traps alone against indoor-biting (83.4% vs. 35.0%) and outdoor-biting (79% vs. 31%), but its advantage over repellents alone was non-existent against indoor-biting (83.4% vs. 81%) and modest for outdoor-biting (79% vs. 63%). Using two traps (1 per hut) offered higher protection than either one trap (0.5 per hut) or four traps (2 per hut). Compared to original distance (5 m from huts), efficacy of push–pull against indoor-biting peaked when traps were 15 m away, while efficacy against outdoor-biting peaked when traps were 30 m away.

Conclusion: The best configuration of push–pull comprised transfluthrin-treated eave ribbons plus two traps, each at least 15 m from huts. Efficacy of push–pull was mainly due to the spatial repellent component. Adding odour-baited traps slightly improved personal protection indoors, but excessive trap densities increased exposure near users outdoors. Given the marginal efficacy gains over spatial repellents alone and complexity of push–pull, it may be prudent to promote just spatial repellents alongside existing interventions, e.g. LLINs or non-pyrethroid IRS. However, since both transfluthrin and traps also kill mosquitoes, and because transfluthrin can inhibit blood-feeding, field studies should be done to assess potential community-level benefits that push–pull or its components may offer to users and non-users.

*Correspondence: ammbando@ihi.or.tz

¹ Environmental Health and Ecological Sciences Department, Ifakara Health Institute, Ifakara, Tanzania

Full list of author information is available at the end of the article



Keywords: Early-night biting, Outdoor-biting, Semi-field chamber, Push–pull, Transfluthrin treated eave-ribbons, CO₂-baited BG-malaria traps

Background

The latest World Malaria Report indicates that global efforts are dangerously off-track [1] and will not meet the important targets of the Global Technical Strategy 2016–2030 to reduce mortality and case incidence by at least 40% by 2020 relative to the 2015 levels [2]. Achieving the overall goals of elimination and eventual eradication will require major revitalization of proven strategies, but also introduction of new tools capable of complementing LLINs and IRS, and addressing gaps associated with challenges such as insecticide resistance [3, 4], increased outdoor biting [5, 6], sub-optimal user compliance [7, 8] and high costs. Expanding the vector control toolbox is an important component of this new agenda, and various new options have been proposed in recent years [9].

The use of spatial repellents [10, 11] or odour-baited mosquito traps [12, 13] have been proposed for consideration either singly, or in combination in the form of push–pull strategies [14, 15]. The underlying assumption of push–pull is that the stimulo-diversionary effects on mosquitoes will ensure that host-seeking vectors repelled from their human targets can be trapped and killed, thereby preventing diversion to unprotected persons, and potentially improving communal protection by removing large densities of mosquitoes from circulation. Indeed, research on personal protection with topical repellents, such as DEET, has demonstrated that mosquitoes can move from protected to unprotected individuals [16]. Even where repellents offer effective protection, poor compliance among users can significantly reduce this protection [7, 8]. This is particularly a challenge with topical repellents, such as picaridin, for which despite high reported acceptance, actual daily user compliance was as low as 8% in a trial in Cambodia [8, 17]. Because of the sub-optimal use even in areas with high access rates, the repellents in this study did not lead to any further reduction in malaria burden [18].

Using spatial repellents may address these compliance challenges, more so with improved delivery formats such as transfluthrin-treated eave ribbons [11, 19], which do not require retreatment for months and can be kept at safe distances from infants. However, even these do not fully address possible diversion to non-users under conditions of incomplete coverage [20]. On the contrary, push–pull strategies, where host-seeking mosquitoes are repelled from their intended

hosts and lured towards traps or other lethal sites [21], could potentially address the compliance issues while also targeting outdoor-biting and insecticide-resistance mosquitoes. Indeed, push–pull has been successfully implemented against agricultural insect pests [21, 22] and has previously demonstrated 95% efficacy against malaria vectors under controlled conditions [15]. If baited with effective lures, traps function as pseudo-hosts and can attract and kill large densities of potentially infectious mosquitoes from an ecosystem [23, 24].

Recently, a small-scale field study conducted in Kilombero valley implementing a non-optimized push–pull system, offered a marginal protection of 30% against wild populations of malaria vectors, with most of the benefits accrued in early evening hours when people are usually outdoors [14]. The low efficacy was attributed to sub-optimal efficiency of the odour-baited device used in the study, and inconsistent levels of the lure, i.e. CO₂ gas from yeast-molasses fermentation. However, most importantly, that push–pull system was not optimized; type and number of traps, distance of the traps from huts, dose of the spatial repellent treatments, or directional orientation of the subunits were all assigned without any prior optimization, thereby not guaranteeing maximum protection against mosquito bites [14].

This current study was, therefore, designed with two objectives, essential for eventual application of push–pull as a complementary tool for malaria prevention. First was to test different configurations of the push–pull system sub-units, i.e. repellents (push sub-unit) and traps (pull sub-units). The model system consisted of long-lasting spatial repellents (the recently developed transfluthrin-treated eave-ribbons technology [19] and odour-baited traps (inverted version of the commonly used BG-Sentinel trap, recently evaluated for trapping malaria mosquitoes [24, 25]). The study used a fixed dose of transfluthrin treatment on the eave ribbons, i.e. 0.25 g/m² ai, previously demonstrated to offer ~75% protection [19], and also a fixed trap type, i.e. BG-Malaria [26, 27], but the number of traps per hut, distance between the traps and huts, and use of the CO₂ gas as lure were varied to determine the optimum.

The second objective of the study was to compare efficacies of complete push–pull system versus either the traps alone or spatial repellents alone, for personal and household protection against indoor-biting and outdoor-biting malaria vectors.

Methods

The semi-field environment

The studies were conducted inside large screened cages at the Ifakara branch of Ifakara Health Institute (IHI), in south-eastern Tanzania, between August 2016 to April 2018. All tests, except those that compare distances of traps from huts were done inside a 200 m² screen house chamber, in which there were two experimental huts mimicking local households in nearby villages and various types of vegetation to mimic local ecosystem. These systems were originally described by Okumu et al. [28], but details of the chamber used in this study, including size, structure and microclimatic conditions have recently been described in Mmbando et al. [19]. On the other hand, the experiments to assess optimal distances between the push and pull subunits were conducted inside a 110 m long tunnel (2 m width and 2.5 m height), located at IHI's Mosquito City facility, ~5 km north of Ifakara town [11]. This tunnel also had an experimental hut constructed inside for experimentation. The two semi-field systems are shown in Fig. 1.

Mosquitoes

Five hundred insectary-reared nulliparous female *Anopheles arabiensis* mosquitoes, aged between 4 and 8 days, were released each evening at 1800 h and left for 30 min before experiments were initiated. The mosquito rearing process has been previously described [29]. In tests conducted inside the 200 m² chamber, all the 500 mosquitoes were released at the centre, equidistant from the two huts, while in tests conducted in the 110 m tunnel, the mosquitoes were divided into three cages (containing ~167; 167; 166 mosquitoes) and released from three

different points to ensure equal distribution of mosquitoes in the tunnel.

Push–pull subunits: odour-baited traps and transfluthrin-treated eave-ribbons

The pull component consisted of BG-Malaria trap, baited with CO₂ gas released at 500 ml/min from a pressurized cylinder via a flow meter and powered by a 12-volt lithium ion battery. The trap, first used in Brazil for trapping *Anopheles darlingi* [26] was selected after initial trials demonstrated its superiority over the common BG-Sentinel trap in tests with *Anopheles* in Tanzania [24, 25]. In the basic plan, the traps were suspended 40 cm above ground, at a distance of 5 metres from each experimental hut. However, these distances were varied in tests conducted inside the tunnel, to either 15 m or 30 m from the huts to assess effects of distances on efficacy of push–pull.

The push component on the other hand consisted of transfluthrin-treated eave ribbons, an innovative new approach recently demonstrated to provide effective protection against both outdoor-biting and indoor-biting malaria vectors in Tanzania [19]. The eave-ribbons were made of hessian fabric and treated with 0.25 g/m² (Bayer Environmental Sciences), which had provided ~75% protection in earlier tests [19]. Doses higher than 0.25 g/m² had resulted in 100% protection, thereby excluding any possibility to test push–pull [19]. The eave ribbons were installed around the eaves of huts without completely covering the spaces (Fig. 1). Full details of the design, treatment and installation of the eave ribbons have been presented elsewhere [10, 19].



Fig. 1 Pictorial illustration of the semi-field chambers and the mosquito tunnel. The semi-field chambers were used to evaluate the different configuration of push-and-pull subunits (a). The 110 m long mosquito tunnel was used to evaluate the optimal distances between the eave-ribbons wrapped along the eave-space of the hut (blue structure inside the chamber) and the odour-baited BG-Malaria trap (b). A section of the empty tunnel is also shown (c). Adult male volunteers sat in the peri-domestic space of each of the huts and collected mosquitoes attempting to bite them between 1800 and 2200 h, before going indoors to sleep under intact bed nets. CDC-light traps were used to catch mosquitoes attempting to bite the sleeper between 2200 and 0630 h the next morning

Study procedures

Experiments were conducted nightly from 1830 to 0630 h over a 9-month period with breaks in between. In both control and treatment settings, adult male volunteers (one volunteer per hut) sat outdoors from 1830 to 2200 h wearing short pants and caught all mosquitoes attempting to bite them, and thereafter moved inside the huts to sleep under untreated bed-nets from 2200 to 0630 h, during which period a CDC-light trap set beside the bed net collected host-seeking mosquitoes. This was done to mimic the natural night-time behaviour of people in the study villages, where they spend early night-hours outdoors and go indoors to sleep mostly after 2200 h [29]. The primary indicator for all experiments was therefore number of mosquitoes caught attempting to bite volunteers sitting outdoors (outdoor-biting risk; assessed by HLC) or sleeping indoors (indoor-biting risk; assessed by CDC light traps).

Tests conducted included: (1) baseline assessment of biting risk indoors and outdoors before adding either push or pull sub-units; (2) testing efficacy of CO₂-baited BG-Malaria traps (pull sub-unit) only; (3) testing efficacy of transfluthrin-treated eave ribbons (push sub-unit) only; (4) testing effects of distances of traps from the huts (i.e. distance between push and pull sub-units); (5) testing effects of numbers of traps on efficacy of push–pull; and (6) testing efficacy of complete push–pull relative to either traps alone or spatial repellent eave ribbons alone. Each test lasted a minimum of 15 nights, including 10 nights with intervention and 5 nights with no intervention (i.e. controls). The controls consisted of untreated bed nets used between 2200 and 0630 h, as the only intervention in place. The huts were cleaned and left unused for at least 72 h (3 days) between tests to minimize any residual effects of transfluthrin.

Testing effects of traps alone (pull only) on outdoor-biting and indoor-biting risk

The experiment was conducted for 15 consecutive nights, starting with five nights of control followed by ten test nights, during which the CO₂-baited BG-Malaria traps [25] were set outdoors, at a distance of 5 m from the huts (1 trap per hut, each on the right side of the huts). Mosquito collections outdoors and indoors were conducted as described above, and biting risk indoors and outdoors compared to the controls.

Testing effects of spatial repellents (transfluthrin-treated eave ribbons) alone (push only) on outdoor-biting and indoor-biting risk

This experiment also lasted 15 consecutive nights, starting with five nights of control followed by ten test nights during which the treated eave ribbons were wrapped

along the eave spaces of the two experimental huts. Indoor and outdoor mosquito collections were performed as described and the outcome indicators compared between control and intervention nights.

Testing effects of spatial repellents and traps combined (push–pull) on outdoor-biting and indoor-biting risk

Here, both transfluthrin-treated eave-ribbons and the CO₂-baited BG-Malaria trap were used concurrently inside the same semi-field-chamber and their effects assessed against biting risk indoors and outdoors. This experiment began with five nights of control (no eave ribbons, and no traps), followed by ten nights for testing the push–pull. Again, mosquito collections done as above.

Testing effects of number of traps on efficacy of push–pull against outdoor-biting and indoor-biting risk

Since varying densities of odour-baited traps (pseudo-hosts) relative to other humans (vertebrate hosts) could influence overall efficacy of such interventions [30], an optimal number of traps should be determined for field applications. Therefore, the transfluthrin-treated eave ribbons were fixed onto the huts and different trap numbers added to achieve the following unique push–pull combinations follows: (1) spatial repellent ribbons plus one trap located at the centre of the semi-field chamber, i.e. 0.5 traps/hut; (2) spatial repellent ribbons plus two traps placed 5 m beside each hut, i.e. 1 trap/hut; and (3) spatial repellent ribbons plus four traps, two were situated beside each hut, i.e. 2 traps/hut. Each combination was tested for 15 nights, starting with five nights of control followed by ten nights of intervention. Mosquito collections were done as described before, and outcome parameters compared between intervention and control settings.

Testing effects of distance between traps and huts on outdoor-biting and indoor-biting risk

It was hypothesized that varying the distance of the trap from the hut could influence the overall efficacy of push–pull, and that an optimal distance would be necessary for field applications [31]. A new experimental hut was designed and constructed following same dimensions as huts used for testing push and pull units in the first experiment. However, unlike the first ones that were made of brick walls and thatch roof, the huts in the tunnel were made of canvas walls on steel frames. Similar sized eave spaces, windows and doors were also fitted. Tests were therefore conducted of a push–pull system with the trap at different distances. This experiment was performed inside the 110 m long mosquito tunnel for a total of 32 nights, including controls. The transfluthrin-treated eave-ribbons were wrapped along the eaves of

the hut without completely closing the eave spaces as described earlier (Figs. 1 and 2). To complete the push–pull system, a single CO₂-baited BG-Malaria trap was installed at either 5 m, 15 m and 30 m distance away from the hut. By assessing different distances between the traps and volunteer-occupied hut, the test also enabled assessment of different distances between the push and pull sub-units, since the spatial repellent was always fixed onto the hut.

Additional tests were conducted in the tunnel with only the transfluthrin-treated eave ribbons, but no traps for 8 nights. Randomization without replacement of the aforementioned trap positions or no trap was used to assign the distance to be evaluated each night (i.e. no trap added, trap added at 5 m, trap added at 15 m or trap added at 30 m from hut).

Data analysis

Data analysis was done using open source statistical software, R version 3.5.0 [30]. Mosquito count data were modelled in Generalized Linear Mixed Models (GLMMs) following a negative binomial distribution using *lme4* package [32]. Treatments such as presence of absence of the sub-units, number of traps, distance between traps and huts, and location (indoor/outdoor) were modelled as fixed factors, while experimental day and hut ID were included in the models as random terms to account for pseudo replication and variation in microclimate between days, i.e. temperature, humidity and winds.

The protective efficacies were computed using relative risk (RR) from a null model following (Control – Treatment)/Control. The significance of the fixed factors

where considered significant when P-value was less than 0.05. Graphs were created using an R graphics package (*ggplot2*) [33]. Means, relative risks and respective 95% confidence intervals (CI) were reported.

Results

Effects of traps alone (pull only), spatial repellents alone (push only) or combinations of traps and spatial repellents (push–pull)

Full details of findings are given in Table 1 and Fig. 3. Mosquito trapping alone (1 trap/hut) offered only modest protection of 35% indoors and 31% outdoors. However, when the spatial repellent (transfluthrin-treated eave ribbons) were used alone, they significantly reduced biting indoors (% protective efficacy = 81.2%; RR = 0.16 (0.09–0.20); $P < 0.01$) and outdoors (% protective efficacy = 63%; RR = 0.4 (0.31–0.51); $P < 0.001$). When the complete push-pull system (consisting of both the spatial repellent and the traps) was tested, it also significantly reduced indoor-biting (% protective efficacy = 83%; RR = 0.16 (0.07–0.32); $P < 0.01$) and outdoor-biting (% protective efficacy = 79%; RR = 0.15 (0.21–0.19); $P < 0.001$).

Effects of varying the number of traps on efficacy of push–pull against outdoor-biting and indoor-biting risk

Findings for these tests are summarized in Table 2 and also Fig. 3. Push–pull with two traps (1 trap/hut) offered 90% protection (RR=0.1 (0.04–0.20); $P < 0.01$), the one with four traps (2 traps/hut) offered 69% protection (RR=0.3 (0.2–0.7); $P < 0.01$), and the one with a single pull-subunit (0.5 traps/hut) offered only 19% protection (RR=0.8 (0.4–1.8); $P > 0.05$) against indoor-biting

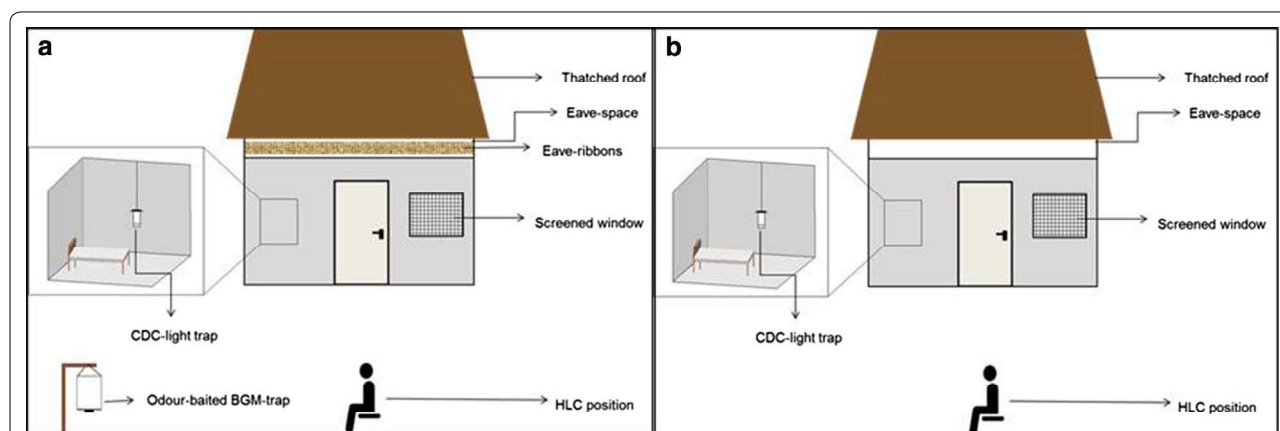
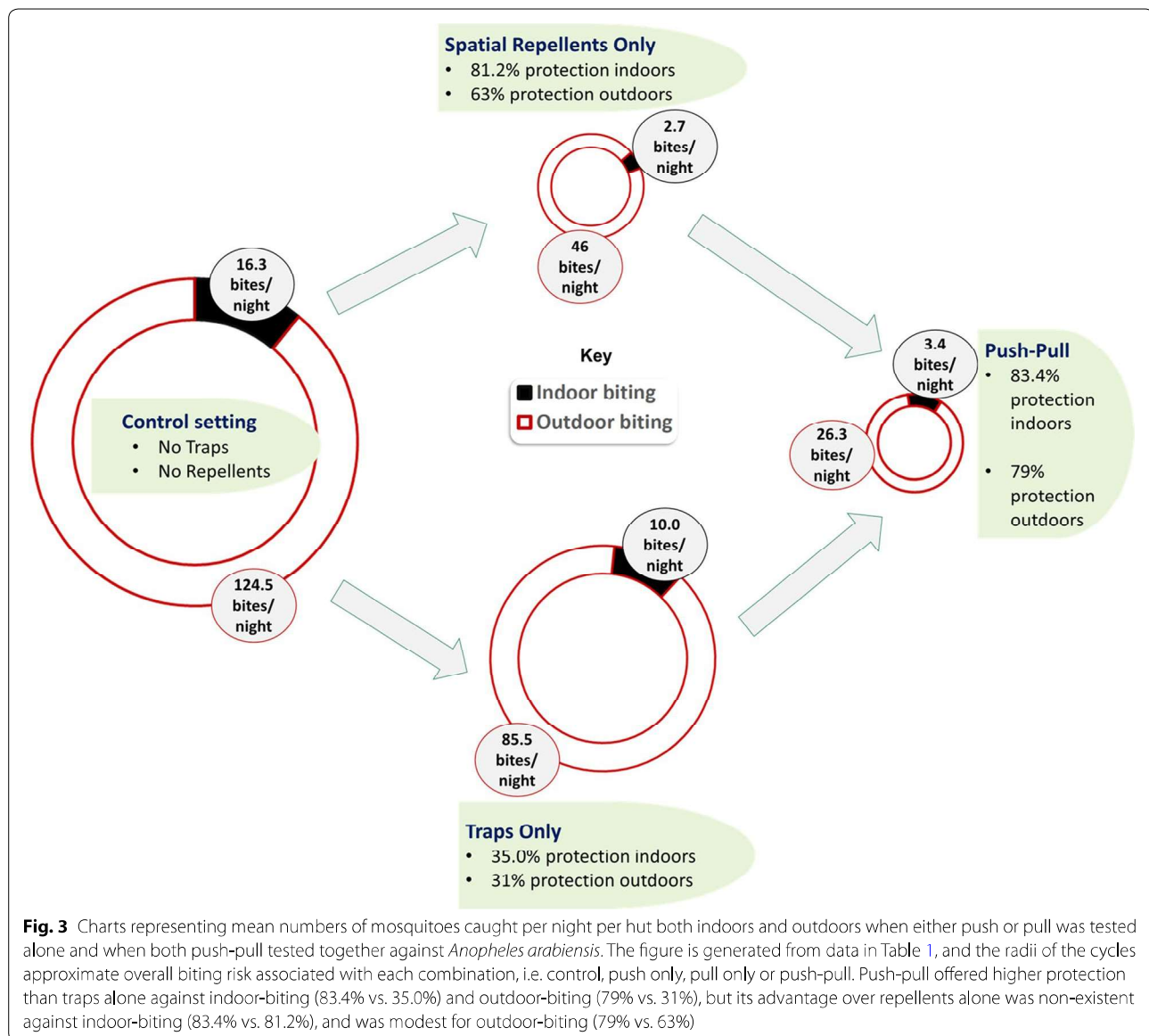


Fig. 2 Illustration of the experimental setup for evaluating push–pull inside semi-field chamber. Adult male volunteers (one volunteer/hut) conducted sat outdoors from 1830 to 2200 h catching mosquitoes attempting to bite him (outdoor-biting), and thereafter moved indoors to sleep under untreated bed-nets from 2200 to 0630 h. Once the volunteer was indoors, a CDC-light trap set beside the bed net was used to collect mosquitoes indoors in each hut. The mosquitoes were always released in the chamber 30 min before volunteers moved in at 1830 h. However, whenever traps were used, they were also switched on at 1830 h. The placement of the transfluthrin-treated eave ribbons, i.e. push sub-unit and the CO₂-baited BG-Malaria trap, i.e. pull sub-unit, are shown in the peri-domestic space (a). Controls had no eave-ribbons nor traps (b)

Table 1 Summary of findings in tests for effects of traps alone (pull only), spatial repellents alone (push only) or combinations of traps and spatial repellents (push-pull) on the biting risk of *Anopheles arabiensis* indoors and outdoors

Intervention	N	Indoor biting risk (assessed using CDC-light trap)				Outdoor biting risk (assessed using human landing catch)				Mosquitoes trapped	
		Mean (95% CI)	RR (95% CI)	% Protection	p-value	Mean (95% CI)	RR (95% CI)	% Protection	p-value	Mean	(95% CI)
Control	15	16.3 (12.9–19.8)	1	N/A	N/A	124.5 (101.6–152.5)	1	N/A	N/A	N/A	N/A
Pull alone (traps)	10	10.0 (7.6–12.4)	0.7 (0.3–1.3)	35.0	0.351	85.5 (71.6–102)	0.7 (0.5–0.9)	31	< 0.01	44.0	(35.5–52.6)
Push alone (spatial repellents)	10	2.7 (1.5–4.0)	0.2 (0.1–0.2)	81.2	0.006	46 (35.7–59.4)	0.4 (0.3–0.5)	63	< 0.01	Na	
Push-pull	10	3.4 (0.5–6.4)	0.2 (0.1–0.3)	83.4	0.002	26.3 (21.9–31.6)	0.2 (0.2–0.3)	79	< 0.01	32.6	(19.7–45.5)



malaria vectors, compared to the control. On the other hand, in outdoor settings, push-pull with two traps (1 trap/hut) offered 80% protection (RR=0.2 (0.1–0.2); $P < 0.01$), the one with four traps (2 traps/hut) offered no protection at all, i.e. 0.0% (RR=1.0 (0.7–1.4); $P > 0.05$), and that with a single trap (0.5 traps/hut) offered an insignificant 10% protection (RR=0.9 (0.7–1.3); $P > 0.05$). In all cases, there was an overlap of the 95% confidence intervals between the three different trapping approaches, indicating they were statistically similar (Table 2), i.e. 45.5 (22.5–91.9) when one trap was used, 54.4 (27.1–109.0) when two traps were used and 50.3 (45.2–55.5) when four traps were used. When the different trapping approaches were compared to one trap (0.5 trap/hut), it was observed that doubling trap densities to

1 trap/hut increased indoor protection by 89.6% and outdoor protection by 83.2%. Interestingly, quadrupling the trap densities to 2 traps/hut increased indoor protection by slightly lower margin, 60.7%, while lowering outdoor protection by 10%.

Effects of varying distances between traps and huts on outdoor-biting and indoor-biting risk observed in the evaluation of push-pull

Findings for these tests are summarized in Table 3. Bite prevention indoors was greater than 80%, regardless of distances at which the traps were placed, and was equally high in settings with spatial repellents alone without any traps (Table 3). In these tests, conducted in the 110 m long tunnel rather than the 200 m² semi-field chamber

Table 2 Summary findings of tests for effects of varying the number of traps on efficacy of push-pull against *Anopheles arabiensis* biting risk outdoors and indoors

No. traps	N	Indoor biting risk (assessed using CDC-light trap)				Outdoor biting risk (assessed using human landing catch)				Mosquitoes trapped	
		Mean (95% CL)	RR (95% CI)	% Protection	p-value	Mean (95% CL)	RR (95% CI)	% Protection	p-value	Mean	(95% CL)
Control	15	27.6 (16.9–44.9)	1	N/A	N/A	239.1 (194.9–293.4)	1	N/A	N/A	N/A	N/A
One trap (0.5/hut)	10	22.4 (12.3–41)	0.8 (0.4–1.8)	19	0.463	219.7 (170.9–282.4)	0.9 (0.7–1.3)	10	0.172	45.5 (22.5–91.9)	
Two traps (1/hut)	10	2.8 (1.3–5.8)	0.1 (0.04–0.2)	90	<0.001	37.0 (28.3–48.4)	0.2 (0.1–0.2)	80	<0.001	54.4 (27.1–109.0)	
Four traps (2/hut)	10	8.9 (4.8–16.7)	0.3 (0.2–0.7)	69	<0.001	235.6 (183.3–302.6)	1.0 (0.7–1.4)	0	0.713	50.3 (45.2–55.5)	

where the first experiments were conducted, outdoor protection was marginal, regardless of trap position or even when there was no trap. In the analyses where the lowest distance of 5 m was set as reference category, indoor protection increased by 44% when distance was increased to 15 m, and by 31% when the distance was increased to 30 m. On the other hand, outdoor protection did not increase upon changing trap location to 15 m away from the huts, but was increased by 17.9% when the trap was moved to 30 m away. Given the higher outdoor biting densities by *An. arabiensis* as observed in all the experiments, these modest improvements of 17.9% translates into significant magnitude of protection compared to indoors. In all cases, the outdoor traps at 5 m and 15 m caught approximately the same number of mosquitoes per night, i.e. 48.8 (43.6–54.7) mosquitoes/night at 5 m from hut and 50.3 (45.0–56.3) mosquitoes/night at 15 m, while the trap at 30 m caught slightly fewer mosquitoes, i.e. 42.2 (37.3–47.7) mosquitoes/night.

Discussion

As the race to expand the malaria vector control tool box accelerates, additional evidence is required on new alternative tools to ascertain their suitability for use in various settings. This study evaluated the benefits of using push–pull as opposed to either the push component (spatial repellents) alone or the pull component (odour-baited mosquito traps) alone. The components were selected based on previous data, which had demonstrated high efficacies of both the transfluthrin-treated eave ribbons [19] and the BG-Malaria trap [23] against malaria vectors in Tanzania.

Spatial repellents and odour baited traps have both separately been proposed as potential new tools for expanding the malaria control tool box, though there is not yet adequate data to justify their large-scale application [9]. For spatial repellents, current focus areas include developing strategies for delivery of active ingredients in ways that ensure long-term efficacy and safety [34] and also improving user compliance, which has previously impaired field effectiveness [17]. On the other hand, for odour-baited traps, focus areas include developing highly effective attractants [23] and improved trapping devices [23], but also on how the technologies can best be combined with existing interventions [28, 31]. Though these two techniques on their own may complement LLINs and IRS [28, 35], they both have unique challenges that have until now limited their individual appeal, especially under sub-optimal coverage [20]. Indeed, a major reason for proposing push–pull instead of either traps only or repellents only is to counter the potential negative effects such as diversion of mosquitoes to non-users and to prevent excessive risk when traps are baited with attractants

that increase mosquito densities in an environment. This study therefore also examined a range of configurations under which push–pull would be most effective in communities.

The dose of transfluthrin used here, i.e. 0.25 g/m² was selected because it had yielded protection below 100% in earlier studies and, therefore, allowed further evaluation of push–pull instead of push alone. A major finding was that push–pull achieved greater protective efficacy than either component alone, with clear superiority superior over traps alone, but its advantage over spatial repellents alone was only marginal. Indeed, most of the gains obtained from push–pull in these experiments can be attributable to the push-component alone.

It had been expected that adding traps would help trap out mosquitoes repelled by the eave ribbons and therefore increase overall protection. However, this was not directly observable here, most likely because the current study assessed only personal and household-level protection, but not community-level protection. It is likely that given the high protective efficacies of the spatial repellents in this system, any additional benefits would only become apparent in community-level trials where both users and non-users are observed. Indeed, in studies by Menger et al. [38], the value of push–pull was much more apparent when the personal protection data was incorporated into mathematical simulations of community-level impact. Future studies should therefore consider such assessments in both user and non-user households, and should also include tests on multiple *Anopheles* species which may have different behaviours. Another possible reason for the marginal additional value of push–pull over spatial repellents alone could be that the mosquitoes were not only repelled but also killed by the transfluthrin. Indeed, in earlier trials where pyrethroid-susceptible *An. arabiensis* were exposed inside the huts with transfluthrin-treated eave ribbons, these mosquitoes were consistently killed, suggesting multiple modes of action of transfluthrin [19]. Such substantial killing-effect of transfluthrin would limit the diversionary effects without the need for trapping.

Also, push–pull systems involving traps and repellents can be also be cumbersome and expensive, especially where the traps are battery-powered and require regular replacement of lures as well as regular repairs. Spatial repellent products such as transfluthrin-treated eave ribbons can therefore offer a ready alternative, which if scaled up could match the overall efficacy of push–pull but at lower costs. Theoretically, an added advantage of high coverage with spatial repellents is that it could minimize the known diversion effects [20], where mosquitoes bite non-users more than users of the spatial repellent

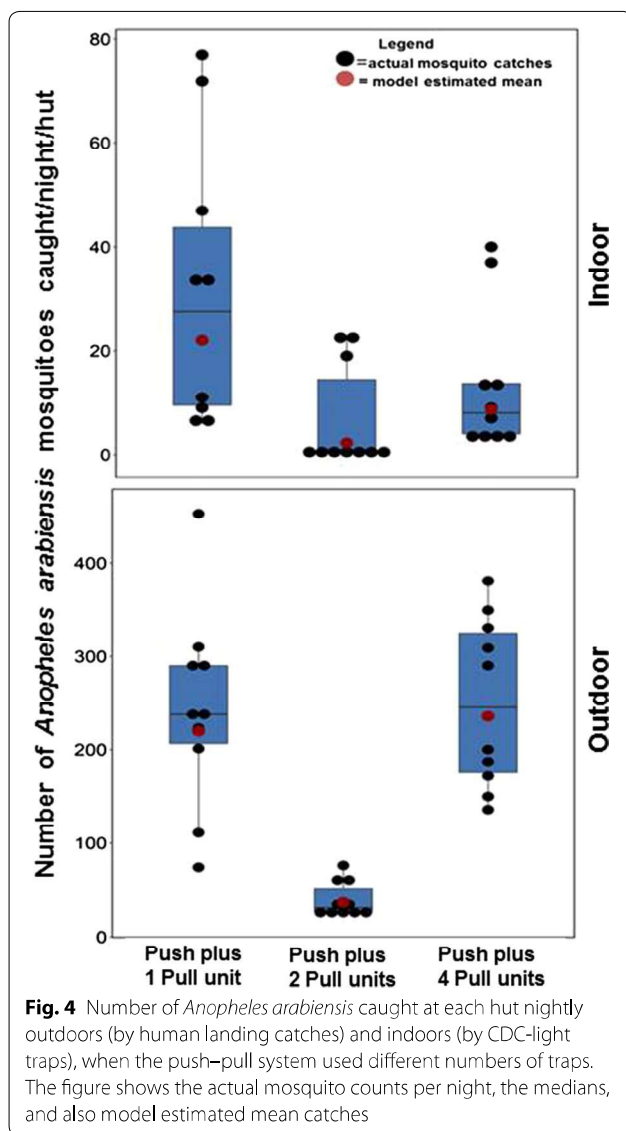
products, especially if the repellent active ingredients also have a killing-effect on the mosquitoes.

An important aspect for consideration here is that the spatial repellent used here was a pyrethroid, transfluthrin. The study therefore does not recommend that the transfluthrin-treated eave ribbons are used for resistance management but rather to offer additional protection against mosquitoes that bite outdoors or indoors at times when people are not using their LLINs. This is a key limitation of this approach and suggests that the search for new active ingredients, particularly those that are non-pyrethroids should continue. The concept of spatial repellents for resistance management could then be applicable if other active ingredients are used. Nonetheless, it was interesting that in a previous study [19], pyrethroid-resistant *An. arabiensis* were sufficiently repelled by transfluthrin-treated eave ribbons. Moreover, when inside huts with 0.02% transfluthrin-treated ribbons, the mosquitoes also died in very high proportions (mortality of 99.5%). This indicates providing both repellent and killing activity could be highly effective against resistant *An. arabiensis*. However, the same study also found that pyrethroid-resistant *An. funestus*, which dominate malaria transmission in rural south-eastern Tanzania were only modestly affected by the transfluthrin-treated eave ribbons [19]. This suggests indeed that the efficacy of transfluthrin-based products would be limited in certain settings. Therefore, to sustain effectiveness and enable resistance management efforts, it is recommended that transfluthrin-treated eave ribbons should be combined with non-pyrethroid interventions, for example organophosphate-based or carbamate-based IRS indoors.

It was hypothesized at the start of the study that increasing trap densities could improve protection, by mass-trapping host-seeking mosquitoes. However, this study determined that while doubling trap densities from 0.5 to 1 trap/hut was beneficial, further increase to 2 traps/hut was detrimental. Probably, this is because the traps increased the concentration of the odour lures (CO₂) in the environment and kept the mosquitoes active enough to increase rather than decrease biting. Obviously even if the study had determined that increasing trap densities would be beneficial, the economic cost would likely be exorbitant. Future developments in trapping technology could potentially lead to higher trapping efficiencies and exclusion of the need for industrial CO₂ gas as used in these experiments, a development that could greatly improve the appeal of host-seeking mosquito traps for control. In this study, presence of CO₂-baited traps at the peri-domestic areas seemed to increase proportions of mosquitoes biting outside and slightly reduced indoor mosquito-biting risks. The

pull-subunits may indeed increase mosquito biting risks to people engaged in various outdoor activities such as story-telling, cooking, dish-washing and drinking [29, 36]. Overall, these findings should however not be interpreted to mean that traps have no value, as assessments here were mostly of personal protection. It is possible that adding traps into the systems would indeed address potential diversion problems while also trapping and killing large number of mosquitoes, thereby contributing to mass community-level benefits for users and non-users. Thus, additional studies are required in field settings to more accurately measure such community-level outcomes including any potential diversion from users to non-users, and distances over which such diversion can occur. One concern with the trapping systems used here was the difficulty in standardization, possibly as a result of differential airflow in the systems, which resulted in discordant trap efficacies between studies in the first tests versus those done in the tunnel. For example, in the first test, one trap for two houses had no significant impact, whereas two traps for two houses had a significant effect, (Fig. 4). However, in the tunnel tests, one trap had no significant impact with just one hut in the system, whatever the distance. In future tests, these differences could be avoided by conducting all studies in similar setting and by improving standardization and airflow in the experimental systems.

The transfluthrin treated hessian eave-ribbons used as an intervention offered significant protection against indoor and outdoor malaria vectors. These results corroborate findings from previous studies, which showed that transfluthrin-treated hessian ribbons can offer more than 75% protection against mosquito bites [10]. In this study, the ribbons were wrapped along the eave spaces of the experimental huts, without blocking the entire eave space. The eave-ribbons with higher concentrations above 0.02% transfluthrin were tested in the same chamber and found to offer 99%–100% protection against indoor and outdoor mosquito biting risks [19]. The mosquito biting protection offered by higher concentrations of transfluthrin treated eave-ribbons described by [19] affected mainly personal and household protection levels and not communal protection level. Though the diversion problem was not explicitly tested in this study, it is one of the aspects that could potentially be addressed by addition of trapping in the field settings, as the traps would take out the mosquitoes before they bite unprotected persons. There is currently an ongoing study by Ifakara Health Institute, which assesses the diversion effects of transfluthrin-treated eave ribbons (Mwanga et al. pers. commun.). The number of mosquitoes trapped by the baited-traps was also slightly lower when both treated eave-ribbons and traps were tested together. This



was probably due to repellent effect or the feeding-inhibition effect of transfluthrin [37]. Such effects probably also reduced the number of mosquitoes, which might be trapped by the baited-trap at the peri-domestic areas.

The addition of odour-baited traps to the eave-ribbons, to form push pull showed modest improvements on personal protection, unlike in previous studies, where presence of baited-traps outdoor undermined the efficacy of push-pull system [38]. The study by Menger et al. indicated no additional effect of having push and pull subunits at the peri-domestic areas. They however also concluded that mosquito biting protection was mainly offered by the push-subunits, which is similar to the findings of this current study [38]. Additionally, during a recent small-scale field evaluations of push-pull, it was determined that presence of the system at the peri-domestic areas

undermined the effects of the odor-baited mosquito landing box (MLB) [14]. However, testing both push-and-pull subunits in this current study did not affect the indoor mosquito biting protection, as this was mainly offered by the push-subunits alone. The study suggested the necessity of optimization studies on the number and the distance of pull subunits needed to offer maximal protection against mosquito bites. The distance between the pull and the human volunteer needed to be optimized to prevent the mosquito attraction competition as reported previously [12, 19]. These aforementioned challenges have now been tackled in the series of push-pull optimization experiments reported in this current study.

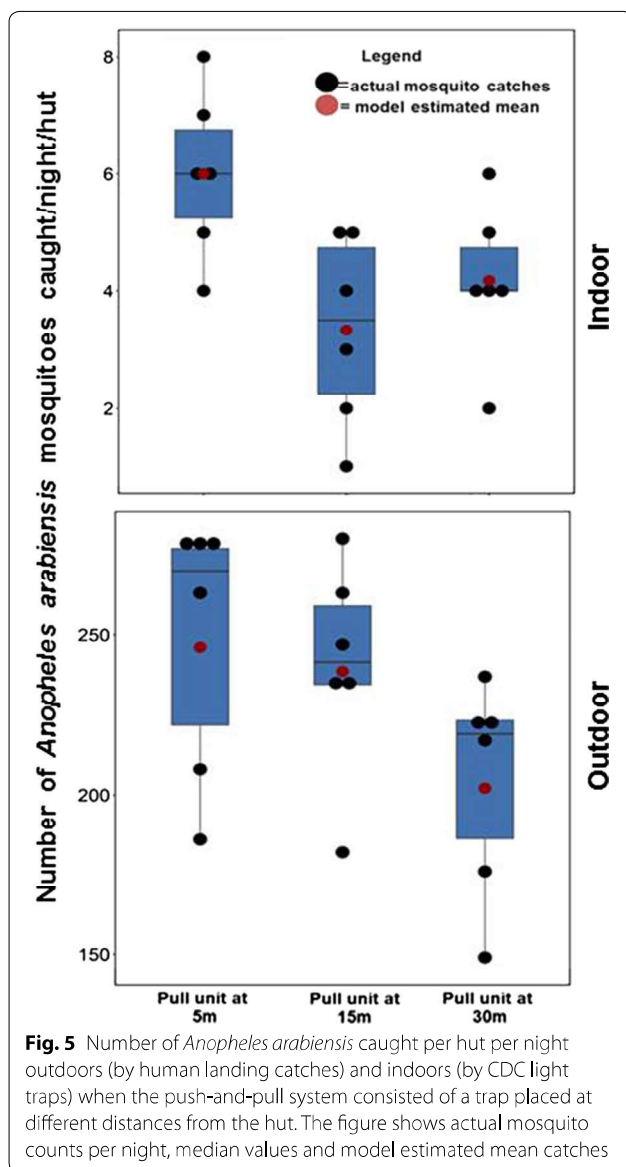
During evaluation of the optimal distances between the push and pull subunits, when the baited trap was situated at either 5 m or 15 m away from the treated ribbons, the trap caught a higher average number of mosquitoes compared to other distances tested. Although, the lower biting protection conferred by the pull-subunit situated at either 5 m or 15 m away from the push-subunit was best for offering communal protection, the best configuration of push-pull was that with traps located at least 15 m away from the huts. Since outdoor biting was greater than indoor-biting, and because traps placed at 30 m away from huts resulted in the greatest reduction in outdoor bites, it can be argued that where outdoor-biting *An. arabiensis* are the main vectors, then the traps should be placed at least 30 m from the huts, (Fig. 5).

Mosquito trapping in these experiments was done by human volunteers outdoors and CDC light traps indoors. Overall, as shown in Tables 1, 2 and 3 and Fig. 3, more mosquitoes were caught outdoors than indoors, which may create an impression that there was lower biting risk indoors. This is mostly because in these experiments, a fixed number of mosquitoes were released each night and outdoor trapping preceded indoor trapping. Though these findings do not invalidate the percentage protection values calculated, there are still many settings across Africa where substantial proportions of malaria transmission events actually occur indoors as opposed to outdoors, in which cases prioritization of indoor protection remains a key. Interpretation of the data should therefore consider the fact that different trapping methods were used indoors and outdoors.

One limitation of this study is that it lacks the field data assess other factors which might influence the efficacy of the push-pull system. These factors may include airflow (wind), which was limited in the semi-field system compared to field settings. Another is the use of pyrethroid susceptible *An. arabiensis* as the only test organism. Further studies are, therefore, needed to assess impact against resistant mosquitoes, and also against other species such as *An. funestus*, where it is the dominant vector. Lastly, these current studies also used untreated nets

Table 3 Summary findings of tests for effects of varying distances between traps and huts (with or without transfluthrin-treated eave ribbons) on *Anopheles arabiensis* outdoor-biting and indoor-biting risk observed in the evaluation of push-pull

Distance	N	Indoor biting risk (assessed using CDC-light trap)				Outdoor biting risk (assessed using human landing catch)				Mosquitoes trapped	
		Mean (95% CI)	RR (95% CI)	% Protection	p-value	Mean (95% CI)	RR (95% CI)	% Protection	p-value	Mean (95% CI)	
Control (no traps & no eave ribbons)	12	42.7 (36.2–42.1)	1	N/A	N/A	274.3 (256.6–292.1)	1	N/A	N/A	N/A	
Eave-ribbons & no traps	6	7.1 (5.4–8.8)	0.2 (0.1–0.2)	83	0.005	278.8 (266.8–290.7)	1.0 (0.9–1.2)	0	0.291	N/A	
Trap at 5 m from hut	6	6.0 (4.9–7.1)	0.1 (0.1–0.2)	86	0.003	248.5 (215.8–281.2)	0.9 (0.8–1.0)	10	0.093	48.8 (41.5–56.2)	
Trap at 15 m from hut	6	3.3 (2.0–4.6)	0.1 (0.1–0.1)	93	0.008	240.3 (213.6–267.1)	0.9 (0.8–1.0)	13	0.361	50.3 (45.2–55.5)	
Trap at 30 m from hut	6	4.2 (3.1–5.2)	0.1 (0.1–0.2)	90	0.001	204 (176.9–231.1)	0.8 (0.7–0.9)	14	0.274	42.1 (38.6–45.7)	



inside the study chambers, which may not represent actual situation in field settings. Future field tests should, therefore, consider using LLINs as primary intervention.

Conclusion

The best configuration of push-pull comprised transfluthrin-treated eave ribbons, plus two traps (1/hut), each at 15 m or 30 m from huts. Efficacy of push-pull was mainly due to the spatial repellent component. Adding odour-baited traps could marginally improve protection, but excessive trap densities may increase biting exposure for near users outdoors. The combination of the push-pull subunits slightly increased the outdoor-biting protection, compared to when the two units were

separately tested. Given the marginal efficacy gains over spatial repellents alone and the complexity of push-pull, it may be prudent to promote just the spatial repellents alongside existing interventions such as LLINs or non-pyrethroid IRS. Since both transfluthrin and traps also kill mosquitoes, and because transfluthrin can inhibit blood-feeding, field studies should be done to assess potential community-level benefits that push-pull or its components may offer to users and non-users. Such studies could also assess potential of the technology against other vector species in different study sites.

Abbreviations

LLINs: long-lasting insecticide-treated bed nets; IRS: indoor-residual spraying; BG: bio-gent; CO₂ gas: carbon dioxide gas; MLB: mosquito-landing box; CDC: Centre for Disease Control; RR: relative-risk ratio; GLLMs: generalized linear mixed models; CL: confidence level; CI: confidence intervals; HLC: human landing catch.

Authors' contributions

ASM and FOO conceived the study and developed the study protocol. ASM, MK, RM, EM and HK conducted the experiments, logistic support and supervised data collection. ASM, HSN and FOO analysed the data. ASM and FOO wrote the manuscript. ASM, HSN, EPAB, EWK, AEE and FOO reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Environmental Health and Ecological Sciences Department, Ifakara Health Institute, Ifakara, Tanzania. ² Laboratory of Technological Innovation of Vector Control, Department of Parasitology, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ³ School of Public Health, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Parktown, Republic of South Africa. ⁴ Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Glasgow, UK.

Acknowledgements

A special thanks to Mr. Stephen Kipande and Mr. Ramji Seleman who volunteered to collect mosquitoes during the study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The dataset obtained from this study is available from the corresponding author upon request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Volunteers who participated in this study were adequately informed about the study objectives, potential benefits and potential risks, after which written informed consent was obtained. Since infection-free laboratory-reared mosquitoes were used in the study, the volunteers were not at risks of being infected with malaria parasites during the experiments. Still, volunteers were provided with free diagnosis and treatment according to Tanzania National Treatment Guidelines in case they fell ill. Ethical approval was obtained from institutional review board of Ifakara Health Institute (IHI/IRB/EXT/09-2017) and the Medical Research Coordinating Council at Tanzanian National Institute of Medical Research (NIMR/HQ/R.8c/Vol. II/838). This manuscript has been approved for publication by the National Institute of Medical Research reference number (NIMR/HQP/P.12VOL. XXVI/28).

Funding

ASM was funded by Wellcome Trust Masters Fellowship in Public Health and the Association of Physicians of Great Britain and Ireland which fund this research (Grant Number 106356/Z/14/Z). EPAB was funded by the

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Grant 88881.133584/2016-01) and AEE funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI) (Grant 310205/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant PPM-00502-15). FOO was also supported by a Wellcome Trust Intermediate Research Fellowship (Grant Number: WT102350/Z/13/Z), a Howard Hughes Medical Institute (HHMI)—Gates International Research Scholarship (Grant No. OPP1175877) and a Bill & Melinda Gates Foundation Grant (Grant No. OPP1177156).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 11 December 2018 Accepted: 8 March 2019

Published online: 20 March 2019

References

- WHO. World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
- World Health Organization. Global Malaria Programme Global technical strategy for malaria, 2016–2030. Geneva: World Health Organization; 2015.
- Rabinovich RN, Drakeley C, Djimde AA, Hall BF, Hay SI, Hemingway J, et al. malERA: an updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLoS Med*. 2017;14:e1002456.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol*. 2011;27:91–8.
- Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J*. 2011;10:80.
- Durnez L, Coosemans M. Residual transmission of malaria: an old issue for new approaches. In *Anopheles mosquitoes: new insights into malaria vectors*. Manguin S, ed. 2013, p. 671–704.
- Moore SJ. A new perspective on the application of mosquito repellents. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:1093–4.
- Gryseels C, Uk S, Sluydts V, Durnez L, Phoeux P, Suon S, et al. Factors influencing the use of topical repellents: implications for the effectiveness of malaria elimination strategies. *Sci Rep*. 2015;5:16847.
- Williams YA, Tusting LS, Hocini S, Graves PM, Killeen GF, Kleinschmidt I, et al. Expanding the vector control toolbox for malaria elimination: a systematic review of the evidence. *Adv Parasitol*. 2018;99:345–79.
- Ogoma SB, Mmando AS, Swai JK, Horstmann S, Malone D, Killeen GF. A low technology emanator treated with the volatile pyrethroid transfluthrin confers long term protection against outdoor biting vectors of lymphatic filariasis, arboviruses and malaria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005455.
- Ogoma SB, Ngonyani H, Simfukwe ET, Mseka A, Moore J, Killeen GF. Spatial repellency of transfluthrin-treated hessian strips against laboratory-reared *Anopheles arabiensis* mosquitoes in a semi-field tunnel cage. *Parasit Vectors*. 2012;5:54.
- Matowo NS, Moore J, Mapua S, Madumla EP, Moshi IR, Kaindoa EW, et al. Using a new odour-baited device to explore options for luring and killing outdoor-biting malaria vectors: a report on design and field evaluation of the Mosquito Landing Box. *Parasit Vectors*. 2013;6:137.
- Mmbando AS, Okumu FO, Mgando JP, Sumaye RD, Matowo NS, Madumla E, et al. Effects of a new outdoor mosquito control device, the mosquito landing box, on densities and survival of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, inside controlled semi-field settings. *Malar J*. 2015;14:494.
- Mmbando AS, Ngowo HS, Kilalangongono M, Abbas S, Matowo NS, Moore SJ, Okumu FO. Small-scale field evaluation of push-pull system against early- and outdoor-biting malaria mosquitoes in an area of high pyrethroid resistance in Tanzania. *Wellcome Open Res*. 2017;2:112.
- Menger DJ, Otieno B, Marjolein de Rijk W, van Loon JJ, Takken W. A push-pull system to reduce house entry of malaria mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2014;12:18.
- Maia MF, Onyango SP, Thele M, Simfukwe ET, Turner EL, Moore SJ. Do topical repellents divert mosquitoes within a community? Health equity implications of topical repellents as a mosquito bite prevention tool. *PLoS ONE*. 2013;8:e84875.
- Heng S, Sluydts V, Durnez L, Mean V, Polo K, Tho S, Coosemans M, van Griensven J. Safety of a topical insect repellent (picaridin) during community mass use for malaria control in rural Cambodia. *PLoS ONE*. 2017;12:e0172566.
- Sluydts V, Durnez L, Heng S, Gryseels C, Canier L, Kim S, Van Roey K, Kerhof K, Khim N, Mao S. Efficacy of topical mosquito repellent (picaridin) plus long-lasting insecticidal nets versus long-lasting insecticidal nets alone for control of malaria: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:1169–77.
- Mmbando AS, Ngowo H, Limwagu A, Kilalangongono M, Kifungo K, Okumu FO. Eave ribbons treated with the spatial repellent, transfluthrin, can effectively protect against indoor-biting and outdoor-biting malaria mosquitoes. *Malar J*. 2018;17:368.
- Maia MF, Kreppel K, Mbeyela E, Roman D, Mayagaya V, Lobo NF, et al. A crossover study to evaluate the diversion of malaria vectors in a community with incomplete coverage of spatial repellents in the Kilombero Valley, Tanzania. *Parasit Vectors*. 2016;9:451.
- Cook SM, Khan ZR, Pickett JA. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Ann Rev Entomol*. 2007;52:375–400.
- Hassanali A, Herren H, Khan ZR, Pickett JA, Woodcock CM. Integrated pest management: the push-pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363:611–21.
- Okumu FO, Killeen GF, Ogoma S, Biswaro L, Smallegange RC, Mbeyela E, et al. Development and field evaluation of a synthetic mosquito lure that is more attractive than humans. *PLoS ONE*. 2010;5:e8951.
- Okumu FO, Madumla EP, John AN, Lwetoijera DW, Sumaye RD. Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations the Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasit Vectors*. 2010;3:12.
- Batista EP, Ngowo H, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Siria DJ, et al. Field evaluation of the BG-Malaria trap for monitoring malaria vectors in rural Tanzanian villages. *PLoS ONE*. 2018;13:e0205358.
- Gama RA, Silva IM, Geier M, Eiras AE. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:763–71.
- Ferguson HM, Ng'habi KR, Walder T, Kadungula D, Moore SJ, Lyimo I, et al. Establishment of a large semi-field system for experimental study of African malaria vector ecology and control in Tanzania. *Malar J*. 2008;7:158.
- Okumu FO, Chipwaza B, Madumla EP, Mbeyela E, Lingamba G, Moore J, et al. Implications of bio-efficacy and persistence of insecticides when indoor residual spraying and long-lasting insecticide nets are combined for malaria prevention. *Malar J*. 2012;11:378.
- Moshi IR, Ngowo H, Dillip A, Msellemu D, Madumla EP, Okumu FO, et al. Community perceptions on outdoor malaria transmission in Kilombero Valley, Southern Tanzania. *Malar J*. 2017;16:274.
- R-core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
- Okumu FO, Govella NJ, Moore SJ, Chitnis N, Killeen GF. Potential benefits, limitations and target product-profiles of odor-baited mosquito traps for malaria control in Africa. *PLoS ONE*. 2010;5:e11573.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw*. 2015;67:1–48.
- Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. *J Stat Softw*. 2017;77:1–3.
- Achee NL, Bangs MJ, Farlow R, Killeen GF, Lindsay S, Logan JG, et al. Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. *Malar J*. 2012;11:164.
- Killeen GF, Smith TA. Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorpency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101:867–80.
- Monroe A, Asamoah O, Lam Y, Koenker H, Psychas P, Lynch M, et al. Outdoor-sleeping and other night-time activities in northern Ghana: implications for residual transmission and malaria prevention. *Malar J*. 2015;14:35.
- Ogoma SB, Ngonyani H, Simfukwe ET, Mseka A, Moore J, Maia MF, et al. The mode of action of spatial repellents and their impact on vectorial capacity of *Anopheles gambiae* sensu stricto. *PLoS ONE*. 2014;9:e110433.
- Menger DJ, Omusula P, Holdinga M, Homan T, Carreira AS, Vandendaele P, et al. Field evaluation of a push-pull system to reduce malaria transmission. *PLoS ONE*. 2015;10:e0123415.

AVALIAÇÃO EM CAMPO DE ATRAENTES SINTÉTICOS PARA UTILIZAÇÃO NA ARMADILHA BG-MALÁRIA PARA CAPTURAR ANOFELINOS NO BRASIL.

Avaliação em campo do efeito da adição de CO₂ aos atraentes IB e MB5

Durante o experimento em campo no município de Manaus (AM), foram capturados apenas anofelinos da espécie *Ny. darlingi*. Vários outros gêneros de culicídeos foram amostrados durante o período do experimento e estão listados no Apêndice 1.

A adição de CO₂ aos atraentes sintéticos IB e MB5 elevou o número de *Ny. darlingi* capturados em relação às armadilhas iscadas com os demais atraentes, sendo significativamente maior do que a armadilha controle ($p < 0,001$) (Tabela 2). Ao analisar os tratamentos, comparando-os em pares, através do teste post-hoc HSD de Tukey, foi encontrada diferença significativa entre os pares formados pelas armadilhas iscadas com os atraentes juntamente com CO₂, IB ($z = 4,09$; $p < 0,001$) e MB5 ($z = 5,13$; $p < 0,001$), e a armadilha controle. Ademais, também houve diferença entre o par formado pelas armadilhas iscadas com o MB5 sem CO₂ e o MB5 com adição de CO₂ ($z = 3,47$; $p < 0,05$). Enquanto que a diferença entre o restante dos pares não foi significativa ($p > 0,05$).

Tabela 2. Estimativa da eficiência de amostragem de fêmeas de *Nyssorhynchus darlingi* capturadas por armadilhasvBG-Malária, iscadas com diferentes atraentes com e sem associação de CO₂, em relação ao controle.

Atraente	Média ± EP	RR (95% IC)	p
Controle	1,04 ± 0,88	1	–
Mbita Blend	2,29 ± 1,44	2,21 (0,92 – 5,29)	0,076
Ifakara Blend	3,21 ± 2,68	3,10 (1,31 – 7,36)	0,010
Ifakara Blend + CO ₂	6,14 ± 2,73	5,93 (2,53 – 13,91)	<0,001
Mbita Blend + CO ₂	9,50 ± 4,40	9,17 (3,93 – 21,41)	<0,001

O CO₂ utilizado no experimento foi originado a partir da fermentação do melão de cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Comparação em campo dos atraentes IB, MB5 e CO₂ para capturar anofelinos.

A partir dos resultados do experimento anterior foi adicionado CO₂ a todos os atraentes avaliados. Além disso nesse experimento uma armadilha iscada somente com CO₂ também foi adicionada. As espécies e a quantidade de anofelinos capturados pelas armadilhas, durante a avaliação dos atraentes IB, MB5 e CO₂ em Manaus-AM estão demonstradas na

tabela 3. Os mosquitos pertencentes aos gêneros *Culex*, *Mansonia*, *Aedes* e *Coquillettidia* também foram representados nas capturas e estão listados no Apêndice 1.

Tabela 3. Espécies de fêmeas de anofelinos capturadas por armadilhas BG-Malária, iscadas com diferentes atraentes, em campo, no Ramal Brasileiro, região periurbana de Manaus – AM e na Vila Minepa, zona rural de Ifakara, Tanzânia.

Espécies	Controle		CO ₂		Mbita Blend		Ifakara Blend	
	Mediana (IIQ)	Total	Mediana (IIQ)	Total	Mediana (IIQ)	Total	Mediana (IIQ)	Total
<i>Nyssorhynchus darlingi</i>	0 (0 – 0,3)	29	4,5 (1 – 11)	177	6 (1,8 – 14)	266	4,5 (1,5 – 7,5)	172
<i>Nyssorhynchus braziliensis</i>	0 (0 – 0)	0	0 (0 – 0)	0	0 (0 – 0)	1	0 (0 – 0)	11
<i>Nyssorhynchus nuneztovari</i>	0 (0 – 0)	2	0 (0 – 0)	0	0 (0 – 0)	0	0 (0 – 0)	0
<i>Anopheles mattogrossensis</i>	0 (0 – 0)	2	0 (0 – 0)	0	0 (0 – 0)	0	0 (0 – 0)	0
Total		33		177		267		183

IIQ = Intervalo interquartil; CO₂ = Armadilha iscada somente com CO₂; aos atraentes Mbita Blend e Ifakara Blend foi adicionado CO₂; o CO₂ utilizado, no experimento, foi originado a partir da fermentação do melão de cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Nos experimentos realizados, em relação às armadilhas controle, as BGMs iscadas com o MB5, suplementado com CO₂, apresentaram melhor desempenho para capturar fêmeas de *Ny. darlingi* [RR = 9,21 95%CI: (4,29 – 19,79); p < 0,001], seguidas das armadilhas iscadas apenas com CO₂ [RR = 6,13 (2,84 – 13,22); p < 0,001] e o IB suplementado com CO₂ [RR = 5,94 (2,77 – 12,76); p < 0,001]. A distribuição dos dados está ilustrada na Figura 15. Ao agrupar os tratamentos em pares para compará-los usando o teste post-hoc HSD de Tukey, foi possível observar que houve diferença significativa somente entre os pares formados por cada tratamento e o controle (MB5 - controle [z = 5,69; p < 0,001], CO₂ – controle [z = 4,63; p < 0,001] e IB - controle [z = 4,57; p < 0,001], não havendo diferença significativa entre os demais pares (p > 0,05).

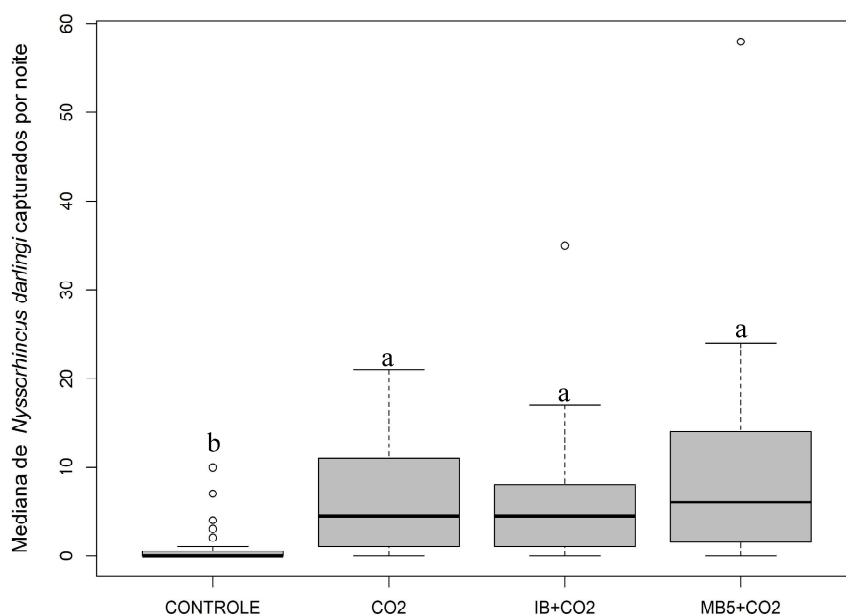


Figura 15. Distribuição do número de fêmeas de *Nyssorhynchus darlingi* capturadas por noite pelas armadilhas BGM, iscadas com diferentes atraentes, em campo no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM. Controle = Armadilha sem isca; CO₂ = Armadilha iscada somente com CO₂; IB+CO₂ = Armadilha iscada com o atraente sintético Ifakara Blend suplementado com CO₂, MB5+CO₂ = Armadilha iscada com o atraente sintético Mbita Blend suplementado com CO₂. O CO₂, utilizado no experimento, foi originado a partir da fermentação do melão de cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As linhas no boxplot representam a mediana e os círculos representam os *outliers*. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

AVALIAÇÃO DA MEMBRANA POLIMÉRICA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ATRAENTE SINTÉTICO IFAKARA BLEND PARA UTILIZAÇÃO NA ARMADILHA BG-MALÁRIA

Comparação em semicampo entre a MP, BG-Cartucho e tiras de nylon como liberadores do atraente Ifakara Blend para capturar *An. arabiensis*

O efeito do método de liberação dos atraentes foi avaliado utilizando a armadilha BGM iscada com IB liberado pela MP, tiras de nylon e BG-Cartucho. Em semicampo, um total de 8000 mosquitos foram utilizados, dos quais 3672 (45,9%) foram recapturados pelas armadilhas. Os resultados demonstraram que houve uma diferença significativa nas capturas realizadas pelos três tratamentos testados e o controle ($p < 0,001$), porém não houve diferença entre os demais pares formados pelos liberadores ($p > 0,05$). A mediana dos mosquitos capturados diariamente e o intervalo interquartil são mostrados na figura 16. As análises demonstraram que dos liberadores avaliados, a MP desenvolvida pelo Lintec atraiu o maior número de mosquitos [RR = 45,21 95%CI: (28,28 – 72,27), $p < 0,001$], seguido pelas tiras de nylon [RR = 35,12 (21,95 – 56,19), $p < 0,001$] e o BG-Cartucho [RR = 29,82 (18,63 – 47,73), $p < 0,001$], quando comparados ao controle.

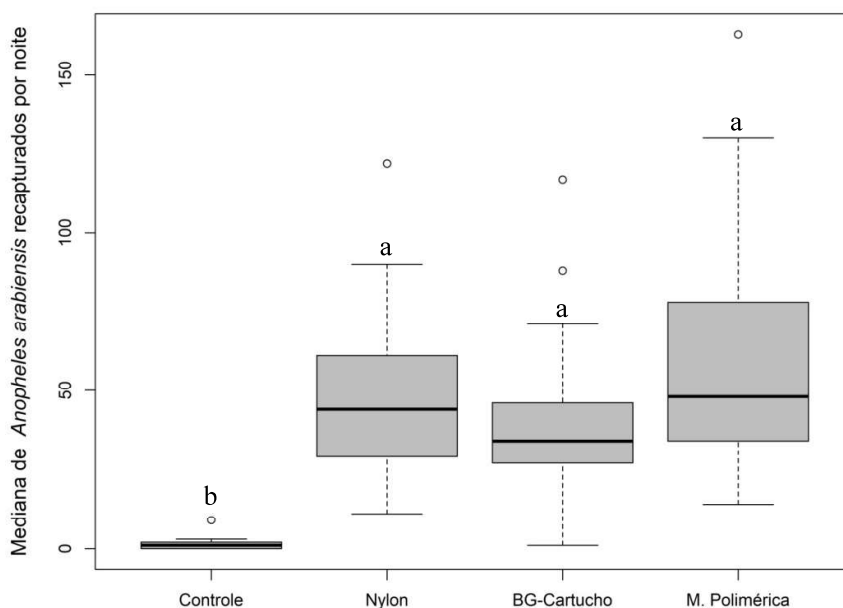


Figura 16. Distribuição do número de fêmeas de *Anopheles arabiensis* recapturadas por noite pelas armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara blend liberado por diferentes liberadores, em semicampo no Ifakara Health Institute. Nylon: grupo de tiras de nylon onde cada tira é impregnada com um dos constituintes do atraente sintético; BG-Cartucho: atraentes infundidos em microcápsulas fornecidas pela Biogents Company revestidos por um cartucho cilíndrico de polipropileno; M. Polimérica: Dispositivo de liberação controlada de atraentes formado por uma Membrana Polimérica desenvolvido no Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores da Universidade Federal de Minas Gerais; Controle: armadilha sem isca. As linhas no boxplot representam a mediana e os círculos representam os *outliers*. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Comparação em campo entre aMP, BG-Cartucho e tiras de nylon como liberadores do atraente Ifakara Blend para capturar anofelinos.

Um total de 15.329 mosquitos foram capturados pelas armadilhas durante a avaliação dos sistemas de liberação do atraente IB em campo em Manaus (Brasil) e Ifakara (Tanzânia) e as espécies e a quantidade de anofelinos estão demonstrados na tabela 4. Os mosquitos pertencentes a outros gêneros da família Culicidae que também foram representados nas capturas estão listados no Apêndice 1.

Tabela 4. Espécies de fêmeas de anofelinos capturadas por armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara Blend liberados por diferentes liberadores em campo, no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM e na Vila Minepa, zona rural de Ifakara, Tanzânia.

Local	Espécies	Controle		Membrana polimérica		Tiras de nylon		BG-Cartucho	
		Mediana (IIQ)	Total	Mediana (IIQ)	Total	Mediana (IIQ)	Total	Mediana (IIQ)	Total
Manaus	<i>Nyssorhincus darlingi</i>	0 (0 – 0,25)	29	5,5 (3,75 – 10)	363	8,5 (3 – 13)	352	4,7 (1,3 – 8,5)	172
	Total		27		363		266		176
Ifakara	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	0 (0 – 1)	10	1 (0 – 5)	107	3 (1 – 7)	103	15 (6 – 27)	474
	<i>Anopheles funestus</i>	0 (0 – 0)	0	0 (0 – 2)	20	0 (0 – 1)	23	1 (0 – 2)	37
	<i>Anopheles pharoensis</i>	0 (0 – 0)	1	0 (0 – 0)	2	0 (0 – 0)	2	0 (0 – 0)	1
	Total		11		129		128		153

IIQ = Intervalo interquartil; Membrana Polimérica = Dispositivo de liberação controlada de atraentes formado por uma matriz porosa, um recipiente impermeável e uma membrana polimérica desenvolvido no Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores da Universidade Federal de Minas Gerais; Tiras de nylon = grupo de tiras de nylon onde cada tira é impregnada com um dos constituintes do atraente sintético; BG-Cartucho = atraentes infundidos em microcápsulas fornecidas pela Biogents Company revestidos por um cartucho cilíndrico de polipropileno; Controle = armadilha sem isca.

Nos experimentos realizados em Manaus, comparadas às armadilhas controle, o tratamento com o melhor desempenho para capturar fêmeas de *Ny. darlingi* foi o grupo de tiras de nylon [RR = 12,8 (6,21 – 26,38); $p < 0,001$], seguida da MP [RR = 12,17 95%CI: (5,88 – 25,21); $p < 0,001$] e BG-Cartucho [RR = 7 (3,32 – 14,74); $p < 0,001$], a distribuição dos dados está ilustrada na figura 17. Ao agrupar os tratamentos em pares para compará-los usando o teste post-hoc HSD de Tukey, foi possível observar que houve diferença significativa somente entre os pares formados por cada tratamento e o controle ($p < 0,001$), não havendo diferença significativa entre os demais pares ($p > 0,05$).

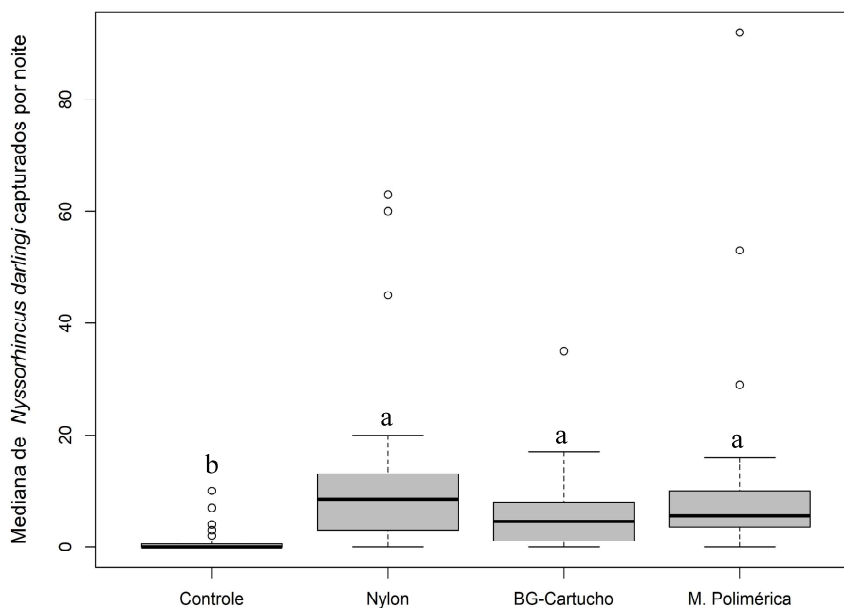


Figura 17. Distribuição do número de fêmeas de *Nyssorhincus darlingi* capturadas por noite pelas armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara blend liberado por diferentes liberadores, em campo no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM. Nylon: grupo de tiras de nylon onde cada tira é impregnada com um dos constituintes do atraente sintético; BG-Cartucho: atraentes infundidos em microcápsulas fornecidas pela Biogents Company revestidos por um cartucho cilíndrico de polipropileno; M. Polimérica: Dispositivo de liberação controlada de atraentes formado por uma matriz porosa, um recipiente impermeável e membrana polimérica desenvolvido no Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores da Universidade Federal de Minas Gerais; Controle: armadilha sem isca. As linhas no boxplot representam a mediana e os círculos representam os *outliers*. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Em Ifakara, os resultados obtidos foram diferentes, sendo o maior número de *An. gambiae s.l.* coletado pela armadilha contendo o BG-Cartucho, o qual foi significativamente maior do que as outras armadilhas ($p < 0,001$) (Tabela 5). A comparação de pares utilizando o teste post-hoc HSD de Tukey demonstrou que houve uma diferença significativa entre os pares formados por cada tratamento e o controle ($p < 0,001$) e os pares formados pelo BG-Cartucho e cada um dos demais tratamentos (BG-Cartucho/Tiras de nylon [$z = 5,28$; $p < 0,001$], BG-Cartucho/MP [$z = 4,62$; $p < 0,001$]).

Tabela 5. Estimativa da eficiência de captura de fêmeas de *Anopheles gambiae* s.l. por noite pelas armadilhas BG-Malária iscadas com o atraente sintético Ifakara blend liberado por diferentes liberadores, em relação ao controle, em campo na Vila Minepa, zona rural de Ifakara, Tanzânia.

Liberadores	Média ± EP	RR (95%IC)	p
Controle	0,4 ± 0,28	1	–
BG-Cartucho	18,96 ± 6,5	47,4 (19,98 – 112,45)	<0,001
Membrana Polimérica	4,28 ± 2,36	10,7 (4,44 – 25,79)	<0,001
Tiras de nylon	4,12 ± 1,63	10,3 (4,27 – 24,85)	<0,001

As análises foram realizadas somente com *Anopheles gambiae* s.l., devido à quantidade de *Anopheles funestus* e outros *Anopheles* spp. capturados ser insuficiente. Tiras de nylon: grupo de tiras de nylon onde cada tira é impregnada com um dos constituintes do atraente sintético; BG-Cartucho: atraentes infundidos em microcápsulas fornecidas pela Biogents Company revestidos por um cartucho cilíndrico de polipropileno; Membrana Polimérica: Dispositivo de liberação controlada de atraentes formado por uma matriz porosa, um recipiente impermeável e membrana polimérica desenvolvido no Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores da Universidade Federal de Minas Gerais; Controle: armadilha sem isca.

6. DISCUSSÃO

A Estratégia Técnica Global para Malária 2016-2030 da OMS, objetiva reduzir o número de casos de malária, em âmbito mundial, em pelo menos 40% até 2020 e 90% até 2030, em relação aos números de 2015²⁰⁵. Entretanto, segundo o Relatório Mundial da Malária de 2017¹⁹⁴, o progresso na redução do número de casos atingidos até 2015 estagnou em muitas regiões e o aumento contínuo da malária nos países com maior incidência, dificulta o alcance dessas metas¹. Dessa maneira, uma revitalização das metodologias de controle vetorial existentes e o desenvolvimento e introdução de novas ferramentas capazes de complementá-las, assim como o monitoramento adequado das populações de vetores, serão necessários para atingir as metas propostas pela OMS²⁰⁶. O presente estudo apresenta a armadilha BG-Malária como uma ferramenta adequada para o monitoramento de vetores de plasmódios, sendo funcional para diferentes espécies de anofelinos em diferentes locais, e, também, como componente de um sistema aplicável como método complementar de controle vetorial.

A busca por ferramentas eficazes para capturar anofelinos continua sendo uma prioridade para os profissionais e pesquisadores da área de monitoramento e controle de vetores. Embora a armadilha mais apropriada possa ser diferente de um lugar para outro e de espécie para espécie, é importante que todas as armadilhas sejam robustas, fáceis de usar, de baixo custo e de rápida manutenção. Baseando-se na necessidade de se obter um método de monitoramento de anofelinos padronizado e aplicável em diferentes regiões para diferentes espécies, a primeira parte deste estudo buscou testar a hipótese de que a armadilha BGM, desenvolvida no Brasil e até então avaliada somente com mosquitos no território brasileiro, pode ser utilizada como um dispositivo de amostragem de mosquitos africanos. Desta maneira, afim de confirmar essa primeira hipótese, a BGM foi avaliada em experimentos realizados em semicampo e campo na Tanzânia, país da África Subsaariana. No primeiro momento, em semicampo, foi verificado que duas vezes mais *An. arabiensis* foram capturados pela BGM do que pela armadilha BGS, cuja eficácia para diferentes espécies de mosquitos já foi demonstrada anteriormente, incluindo o vetor de plasmódios, *An. gambiae s.s.*^{166,207,208}, o que faz a BGS ser amplamente utilizada para fins de pesquisa e vigilância entomológica. Em um estudo onde a BGS foi comparada com a Suna Trap, a armadilha de luz CDC e a Mosquito Magnet X (MM-X), a BGS capturou números superiores de *An. gambiae s.l.* que as outras armadilhas²⁰⁹. Schmieid, et al.¹⁶⁶ também demonstraram uma maior eficiência na captura de *An. gambiae s.s.* quando comparado à armadilha MM-X em um estudo em semicampo na Tanzânia. Em um estudo de campo conduzido no Brasil, ao mudar a orientação da armadilha BGS e instalá-la de cabeça para baixo, 40cm acima do solo,

observou-se que o número de *Ny. darlingi* capturados aumentou consideravelmente¹²⁸. Devido à essa primeira adaptação e, posteriormente, outras que tornaram a armadilha específica para anofelinos, a BGS foi rebatizada para BGM, cuja avaliação final demonstrou a alta eficácia dessa armadilha ao capturar um número de anofelinos similar à HLC¹²⁸. Os resultados aqui apresentados demonstraram que essas modificações também funcionaram para anofelinos africanos.

Seguido do experimento em semicampo, a completa validação da BGM como uma ferramenta de monitoramento eficaz para múltiplos vetores de plasmódios, foi realizada nos experimentos em campo, onde foram obtidos os mesmos resultados em relação à BGS. Por outro lado, em relação à HLC, método adicionado nos experimentos em campo, a BGM capturou um número aproximadamente 6 vezes menor de *An. gambiae s.l.* A espécie *An. gambiae ss.* é considerada o vetor mais importante do continente Africano⁴², no entanto, nesse estudo nenhum *An. gambiae s.s.* foi capturado, sendo 100% dos espécimes do complexo *An. gambiae s.l.* identificados pelas análises moleculares como sendo da espécie *An. arabiensis*. Interessantemente, a quantidade de mosquitos da espécie *An. funestus s.s.* capturada foi semelhante para ambos os métodos. Considerando que trabalhos anteriores relataram a mudança na composição de espécies vetoradas em muitos locais na África Subsaariana^{69,71}, demonstrando a drástica redução da população de *An. gambiae s.s.*⁶⁸, o *An. arabiensis* se tornando o vetor mais abundante⁶⁶ e a ascensão do *An. funestus s.s.* como vetor dominante^{58,210} que transmite quase nove de cada dez novos casos de malária na Tanzânia⁷⁵, os resultados apresentados pelo presente estudo demonstram o grande potencial da BGM como substituta para a HLC. De forma geral, o monitoramento dessas dinâmicas entre as populações de vetores exige um novo conjunto de ferramentas de amostragem fáceis de usar, de baixo custo e padronizáveis em diferentes ambientes⁵².

Nos últimos anos, alguns avanços foram feitos na busca por melhores métodos de amostragem de mosquitos e o desenvolvimento de atraentes sintéticos altamente eficazes que simulam os odores naturais do hospedeiro^{173,174} é um exemplo disso. Nesse contexto, após a validação da BGM como uma promissora ferramenta de amostragem de anofelinos, foi dado início a uma série de trabalhos buscando a sua otimização. Dessa forma, para dar sequência ao estudo buscou-se avaliar a segunda hipótese: “A eficiência de captura da BGM é otimizada pela adição de odores humanos sintéticos como iscas para anofelinos, tanto no Brasil quanto na Tanzânia”. Embora originalmente tenha sido proposta para ser usada com gelo seco como fonte de CO₂ como isca, devido ao interior espaçoso da BG-Malária é possível adicionar uma ampla variedade de atraentes em seu interior. Deste modo, no presente trabalho, a BGM foi

testada quando iscada com outros atraentes, sendo observada então a possibilidade de utilizá-la com vários deles.

O papel do CO₂ na atratividade de anofelinos é bem conhecido^{143,157,211} e sua utilização como isca em armadilhas, normalmente ocorre através de cilindros metálicos de gás pressurizado¹⁷⁶, gelo seco²¹² e combustão de propano²¹³. No entanto, essas fontes têm um custo elevado e, muitas vezes, de difícil acesso, além de não serem sustentáveis para a utilização em grande escala. Apesar de ser a opção de menor custo, o gelo seco evapora mais rápido nos trópicos do que em áreas temperadas, tendo que ser substituído com maior frequência. Para superar essas limitações, a utilização do CO₂, produzido pela fermentação do açúcar pela levedura *S. cerevisiae*, vem sendo cada vez mais utilizada em armadilhas para capturar mosquitos²¹⁴⁻²¹⁸, mostrando-se como uma fonte alternativa de CO₂ eficaz, de baixo custo e de fácil utilização em campo, atraindo mosquitos de forma semelhante ao cilindro de gás pressurizado²¹⁷ e o gelo seco (Batista e Eiras, dados não publicados). Embora o melaço de cana fermentado por *S. cerevisiae* não tenha sido comparado a outras fontes de CO₂ no presente estudo, os resultados apresentados confirmam as descobertas anteriores sobre a sua eficácia como isca em armadilhas, onde foi demonstrado que a BGM, quando iscada com essa mistura, foi capaz de capturar anofelinos de diferentes espécies tanto no Brasil, quanto na Tanzânia. Com base nesses resultados e de estudos anteriores que demonstraram o efeito sinérgico do CO₂ com outros compostos^{165,167,168}, aos atraentes sintéticos IB e MB5 foi adicionado CO₂. Da mesma forma, foi observado um aumento considerável na resposta das fêmeas de *Ny. darlingi* aos atraentes com a adição de CO₂, em comparação aos mesmos atraentes sem suplementação de CO₂, cuja atratividade não foi diferente da armadilha controle (sem isca), corroborando com os estudos anteriores^{174,207,208,219,220}. A partir dos resultados obtidos nesse experimento, nos demais testes, além dos atraentes suplementados com o CO₂, também foi adicionada uma armadilha iscada somente com CO₂, para que dessa forma fosse possível completar o cenário de avaliação CO₂/atraentes sintéticos.

O número de mosquitos capturados nas armadilhas iscadas com os atraentes IB e MB5 aumentou significativamente ao se adicionar o CO₂, porém foi encontrada apenas um efeito aditivo entre eles, uma vez que quando foi avaliada uma armadilha iscada somente com CO₂, os resultados obtidos não foram diferentes dos demais atraentes avaliados em ambos os países para suas respectivas espécies vetoras. Além do CO₂, um dos metabólitos primários da fermentação de açúcar pela *S. cerevisiae*, outros produtos também são gerados a partir dessa fermentação como metabólitos secundários, incluindo outros álcoois e ácidos orgânicos^{221,222}. O ácido acético e o ácido capróico, exemplos de metabólitos secundários do metabolismo

fermentativo da *S. cerevisiae*, são substâncias descritas como atraentes para várias espécies de mosquitos, entre elas o *Anopheles gambiae s.s.*¹⁵⁵.

Mesmo com a utilização de um potente atraente sintético, o aperfeiçoamento das armadilhas depende em parte da eficácia e sustentabilidade dos materiais escolhidos para a distribuição dos odores, pois a efetividade desse atraente é fortemente influenciada pelo sistema de liberação selecionado^{178,188,190}. Em vista disso, apesar do atraente IB não ter se destacado em relação aos demais atraentes, a sua otimização com sistemas de liberação de odores constituídos por diferentes materiais, foi a etapa seguinte desse estudo. Essa nova etapa envolveu dois momentos: (i) a comparação do liberador original desenvolvido no *Ifakara Health Institute*, tiras de nylon, à liberadores comercialmente disponíveis fornecidos pela Biogents Company e (ii) a avaliação de um novo dispositivo de liberação. No primeiro momento, o estudo foi somente realizado na Tanzânia e os resultados revelaram que a maior quantidade de *An. gambiae s.l.* capturada estava associada aos dispositivos de liberação da Biogents Company, BG-Sachê e BG-Cartucho, que correspondem a microcápsulas poliméricas impregnadas com os constituintes do IB e envoltas ou por um envelope de filme de policloreto de vinila ou por um cartucho de polipropileno, respectivamente.

No segundo momento, um sistema de liberação recentemente desenvolvido e patenteado pela UFMG, Membrana Polimérica (MP), foi utilizado para liberar com sucesso o atraente sintético Ifakara Blend e capturar, em semicampo e campo, mosquitos que transmitem plasmódios no Brasil e na Tanzânia. De forma geral, o maior número de anofelinos aqui capturados foram associados aos liberadores poliméricos, MP e BG-Cartucho, em ambos os países. Nesse estudo, a MP foi avaliada pela primeira vez como uma fonte de liberação para atraentes para anofelinos e o seu desempenho foi comparável à liberadores largamente utilizados, mesmo em ambientes diferentes com vetores de espécies diferentes. Assim como as tiras de nylon, a MP é de preparação fácil e rápida e além disso, apresenta maior estabilidade e controle para liberar os compostos, ao contrário do nylon, cuja taxa de liberação é desconhecida. Uma outra vantagem da MP é o baixo custo de produção, o qual resulta em um valor final de aproximadamente R\$5,00 por liberador+atraente (o valor foi calculado sem incluir a mão de obra), enquanto que o BG-Cartucho+atraente é comercializado pela Biogents por R\$129,79 (€30,00 – cotado em 02/08/2019).

Durante o desenvolvimento da MP foram realizados experimentos preliminares para avaliar a sua taxa de liberação através do método gravimétrico em semicampo, que consiste em pesar o liberador em intervalos diários para determinar a porcentagem de perda de massa com o tempo (dados não publicados). Contudo, a dificuldade dessa técnica é a falta de precisão para avaliar as taxas de liberação, pois devido à presença de umidade e poeira

depositada, a massa dos liberadores pode aumentar em vez de diminuir. Dessa forma, mais experimentos com técnicas mais sensíveis são recomendados, como a extração de solventes orgânicos, a qual consiste na extração total dos cairomônios para determinar a concentração residual dos compostos permitindo a sua qualificação e quantificação por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas.

Com a conclusão dos trabalhos de otimização da BGM, uma nova etapa do estudo foi iniciada com o intuito de complementar os experimentos anteriores de validação da armadilha. Para isso, foram realizados vários experimentos em um estúdio de filmagem equipado com câmeras de alta resolução com infravermelho, para elucidar o comportamento dos mosquitos ao se aproximarem da armadilha, visando a utilização do conhecimento adquirido em novos trabalhos de otimização para melhorar o seu mecanismo de captura. Assim como nos experimentos anteriores, as análises em vídeo demonstraram a preferência das fêmeas de *An. arabiensis* pela BGM em relação à BGS, ao visitarem mais, voarem mais rápido e permanecerem mais tempo próximas a BGM. Além disso, várias manobras no voo e mudanças rápidas de direção foram observadas quando os mosquitos se aproximavam da entrada da BGM, demonstrando uma dinâmica de voo descendente/ascendente, o que acaba por facilitar a captura, uma vez que o fluxo de ar da armadilha é ascendente, dificultando o escape dos mosquitos. Um outro aspecto interessante observado nesse trabalho foi a propensão dos mosquitos voarem mais próximos ao solo. Embasado nesses resultados e em estudos anteriores que demonstraram a tendência dos anofelinos de pousar nas partes do corpo mais próximas ao solo^{223,224}, um novo experimentado foi elaborado para testar a hipótese de que a resposta dos mosquitos à BGM seria maior se a mesma fosse instalada mais próxima ao solo. A hipótese foi confirmada ao ser observado que os mosquitos visitaram mais a BGM instalada a 20 cm acima do solo do que as armadilhas instaladas em uma altura maior. Assim sendo, considerando a combinação desses padrões de voo observados no presente estudo, os odores do pé humano e as correntes de convecção, é possível compreender o comportamento típico de anofelinos picarem preferencialmente os membros inferiores de seus hospedeiros.

Por fim, com a conclusão desta etapa, os trabalhos de validação e otimização da BGM foram finalizados e a etapa final deste estudo foi iniciada, na qual a BGM, além de ferramenta de monitoramento, também foi avaliada como parte de um sistema de controle vetorial, o sistema *push-pull*. O desenho experimental dessa etapa foi elaborado a partir do trabalho de Mmbando, et al.²²⁵, os quais sugeriram que estudos para otimizar o número e a distância dos componentes *pull* necessitavam ser realizados para oferecer a maior proteção possível contra picadas de mosquitos. De forma geral, o sistema completo ofereceu uma proteção maior contra picadas de mosquitos em relação aos componentes avaliados isoladamente, com clara

superioridade do repelente sobre as armadilhas, porém estatisticamente semelhante à transflutrina. Consequentemente, os resultados observados do *push-pull* nesses experimentos foram atribuídos ao componente *push*.

Era esperado que a adição das armadilhas ajudasse a capturar os mosquitos repelidos pela transflutrina e aumentasse a proteção geral, porém, isso não foi observado. É provável que devido aos outros efeitos da transflutrina nos mosquitos além da repelência, como a inibição da alimentação sanguínea²²⁶ e as altas taxas de mortalidade em mosquitos expostos ao repelente¹⁰², os demais benefícios que poderiam ser obtidos com a adição das armadilhas tenham sido suprimidos. Além disso, a hipótese de que o aumento da quantidade de armadilhas poderia aumentar a proteção através da captura em massa dos mosquitos não foi confirmada, uma vez que os resultados demonstraram que embora dobrar o número de armadilhas de 0,5 para 1 armadilha/casa tenha sido benéfico, o aumento para 2 armadilhas/casa acabou sendo prejudicial. Em relação à distância entre os componentes *push* e *pull*, a proteção contra picadas dos mosquitos foi menor quando as armadilhas estavam mais próximas do *push*, evidenciando que a melhor configuração do sistema foi com as armadilhas localizadas a pelo menos 15m das casas com transflutrina.

Essa etapa do estudo foi inteiramente realizada em semicampo, o que causou certas limitações no decorrer do trabalho, principalmente no que se refere ao papel da BGM na proteção oferecida pelo sistema, que foi mínimo em relação à transflutrina. Possivelmente, mesmo com as altas taxas de proteção da transflutrina neste sistema, é provável que o real impacto do uso das armadilhas se tornariam mais evidentes em estudos de nível comunitário em que usuários e não usuários do sistema fossem observados. No estudo de Menger, et al.²²⁷, também realizado em semicampo, foi demonstrado que a presença de armadilhas no peridomicílio diminuiu a eficácia do sistema *push-pull*, o qual não apresentou nenhum impacto positivo na densidade de mosquitos presentes no ambiente. No entanto, nesse mesmo estudo, os autores relataram que as vantagens do sistema, principalmente da adição das armadilhas, foram muito mais evidentes quando os dados foram incorporados em simulações matemáticas do impacto a nível comunitário. Por esta razão, acredita-se que é possível que a adição de armadilhas no sistema minimize os problemas de desvio de mosquitos de um ambiente protegido para outro desprotegido, uma vez que ao mesmo tempo em que capturam também matam um grande número de mosquitos, podendo contribuir assim, para proteger a comunidade como um todo. Dessa maneira, estudos adicionais em campo são necessários para medir esses efeitos com mais precisão, num âmbito maior que o de semicampo, incluindo qualquer desvio potencial de usuários para não usuários, e as distâncias em que esse desvio pode ocorrer.

Concluindo, o presente estudo reforça a necessidade de uma ferramenta de amostragem de anofelinos tão eficaz quanto a HLC para substituí-la com segurança e eficiência e a armadilha BG-Malária, atualmente, é a candidata com maior potencial para esse fim. Contudo, novos estudos para otimizá-la e aumentar o seu mecanismo de captura são necessários e a compreensão do comportamento dos mosquitos a sua volta é primordial. Além disso, destaca-se a possibilidade da utilização da BGM como ferramenta de controle de vetores e novos estudos com essa finalidade, especialmente sobre novas formas de utilização, são recomendados. Dessa forma, essas abordagens podem representar não só uma revitalização dos métodos de monitoramento, mas também a introdução de uma nova ferramenta para complementar as técnicas de controle atualmente utilizadas, contribuindo assim para atingir as metas propostas pela OMS²⁰⁶ no combate à malária.

7. CONCLUSÕES

- A armadilha BG-Malária é apresentada como um método eficaz para capturar anofelinos africanos, principalmente por ter capturado um número de *Anopheles funestus s.s.* semelhante à atração humana, agregando os resultados ao estudo iniciado por realizado com anofelinos brasileiros e, assim, validando a eficácia da BGM como um método de amostragem de vetores de plasmódios em diferentes regiões.

- A BG-Malária pode ser utilizada com diversos atraentes, dentre eles misturas de compostos como Ifakara Blend e Mbita Blend e, também, CO₂ produzido pela fermentação de melão de cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o qual se mostrou como uma fonte de CO₂ eficaz e de baixo custo.

- A eficácia do Ifakara Blend foi maior quando dispersado por dispositivos de liberação de odores de matriz polimérica, como os liberadores BG-Sachê e BG-Cartucho da Biogents Company.

- A Membrana Polimérica é eficaz para liberar o Ifakara Blend e atrair fêmeas de anofelinos de diferentes espécies com diferentes comportamentos, tanto no Brasil quanto na Tanzânia. Portanto, devido ao desempenho satisfatório apresentado pela Membrana Polimérica e ao baixo custo e facilidade de produção, a mistura de odores sintéticos do Ifakara Blend e a Membrana Polimérica podem ser utilizados em armadilhas do tipo BG-Malária para o monitoramento de vetores de plasmódios em diferentes regiões.

- Nas análises videográficas foi observado uma maior atividade dos mosquitos em torno da BG-Malária em comparação à armadilha BG-Sentinel, confirmando a superioridade dessa armadilha. Durante essas análises também observou-se uma maior resposta dos mosquitos quando a altura de instalação da BG-Malária foi reduzida de 40 cm para 20 cm em relação ao solo.

- O uso combinado da armadilha BGM e das faixas impregnadas com transflutrina aumentou a proteção contra picadas de *An. arabiensis* no ambiente peridomiciliar, em relação às avaliações dos componentes isoladamente. A eficácia do sistema foi atribuída, principalmente, à transflutrina. Adicionar as armadilhas aumentou superficialmente a proteção contra picadas de *An. arabiensis* oferecida pelo sistema, porém, o número excessivo de armadilhas aumentou a taxa de picadas no peridomicílio. A melhor configuração do sistema *push-pull* foi formada pelas faixas impregnadas com transflutrina (0,25g/m²) e duas armadilhas iscadas com CO₂ (1/casa) instaladas a 15m ou 30m de distância das casas.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar novas alterações na BG-Malária com a adição de atrativos térmicos na armadilha, de modo que ela atinja uma temperatura semelhante à temperatura corporal humana.
- Identificar e quantificar via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas os metabólitos secundários produzidos pela fermentação de melaço de cana pela levedura *S. cerevisiae* utilizados por mosquitos para localizar seus hospedeiros.
- Realizar estudos em campo para avaliar o sistema *push-pull* e a proteção que ele pode oferecer aos membros de uma comunidade.
- Quantificar a taxa de liberação da Membrana Polimérica para determinar o período de liberação constante do odor e a atividade residual de longa duração nos mosquitos-alvo.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

9.1 Produções resultantes da execução da tese

Batista EPA, Ngowo HS, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Okumu FO, et al. Semi-field assessment of the BG-Malária trap for monitoring the African malária vector, *Anopheles arabiensis*. *PloS One*. 2017; 12(10):e0186696.

Batista EPA, Ngowo HS, Opiyo M, Shubis GK, Meza FC, Siria DJ, et al. Field evaluation of the BG-Malária trap for monitoring malária vectors in rural Tanzanian villages. *PloS One*. 2018; 13(10):e0205358.

Batista EPA, Mapua SA, Ngowo HS, Matowo NS, Eiras AE and Okumu FO. Flight behaviour of host-seeking *Anopheles arabiensis* towards BG-Malária trap. *PloS One*. 2019;14(7):e0220563.

Mmbando AS, **Batista EPA**, Kilalangongono M, Finda MF, Mwanga EP, Kaindoa EW, et al. Evaluation of a push-pull system consisting of transfluthrin-treated eave ribbons and odour-baited traps for control of indoor and outdoor-biting malária vectors. *Malaria Journal*. 2019; 18(1): 87.

Peres AM, Eiras AE, **Batista EPA**. Membrana polimérica, processo de fabricação, dispositivo e uso para liberação controlada de atraentes ou repelentes para insetos. 2019. Patente: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020190110783, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 29/05/2019.

9.2 Produções resultantes das colaborações

Rodrigues MS, **Batista EPA**, Silva AA, Costa FM, Neto VA, Gil LHS. Change in *Anopheles* richness and composition in response to artificial flooding during the creation of the Jirau hydroelectric dam in Porto Velho, Brazil. *Malaria Journal*. 2017;16(1):87.

Siria DJ, **Batista EPA**, Opiyo MA, Melo EF, Sumaye RD, Ngowo HS, et al. Evaluation of a simple polytetrafluoroethylene (PTFE)-based membrane for blood-feeding of malaria and dengue fever vectors in the laboratory. *Parasites & vectors*. 2018;11(1):236.

10. REFERÊNCIAS

- 1 WHO. *World Malaria Report*. (World Health Organization, 2018).
- 2 Mueller, I., Zimmerman, P. A. & Reeder, J. C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends in parasitology* **23**, 278-283 (2007).
- 3 Singh, B. & Daneshvar, C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical microbiology reviews* **26**, 165-184 (2013).
- 4 Rajahram, G. S. *et al.* Falling *Plasmodium knowlesi* malaria death rate among adults despite rising incidence, Sabah, Malaysia, 2010–2014. *Emerging infectious diseases* **22**, 41 (2016).
- 5 Grigg, M. J. *et al.* Age-related clinical spectrum of *Plasmodium knowlesi* malaria and predictors of severity. *Clinical infectious diseases* **67**, 350-359 (2018).
- 6 Ta, T. H. *et al.* First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malaria journal* **13**, 68 (2014).
- 7 Singh, B. *et al.* Naturally acquired human infections with the simian malaria parasite, *Plasmodium cynomolgi*, in Sarawak, Malaysian Borneo. *International Journal of Infectious Diseases* **73**, 68 (2018).
- 8 Imwong, M. *et al.* Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. *The Journal of infectious diseases* **219**, 695-702 (2018).
- 9 Lalremruata, A. *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine* **2**, 1186-1192 (2015).
- 10 Brasil, P. *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health* **5**, e1038-e1046 (2017).
- 11 Harbach, R. E. *Mosquito taxonomic inventory*, <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info>> (2019).
- 12 Foster, P. G. *et al.* Phylogeny of Anophelinae using mitochondrial protein coding genes. *Royal Society Open Science* **4**, 170758 (2017).
- 13 Sinka, M. E. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors* **5**, 69 (2012).
- 14 Forattini, O. P. in *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia*: v. 2 (2002).

- 15 Forattini, O. P. *Entomologia médica: parte geral, Diptera, Anophelini*. Vol. 1 (Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia, 1962).
- 16 Trung, H. D. *et al.* Behavioural heterogeneity of Anopheles species in ecologically different localities in Southeast Asia: a challenge for vector control. *Tropical Medicine & International Health* **10**, 251-262 (2005).
- 17 Al-Taiar, A. *et al.* Socioeconomic and environmental factors important for acquiring non-severe malaria in children in Yemen: a case-control study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**, 72-78 (2009).
- 18 Laporta, G. Z. *et al.* Malaria vectors in South America: current and future scenarios. *Parasites & vectors* **8**, 426 (2015).
- 19 Sinka, M. E. *et al.* The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors* **3**, 72 (2010).
- 20 Conn, J. E. & Ribolla, P. E. in *Genetic control of malaria and dengue* 81-102 (Elsevier, 2016).
- 21 Rios-Velásquez, C. M. *et al.* Experimental Plasmodium vivax infection of key Anopheles species from the Brazilian Amazon. *Malaria journal* **12**, 460 (2013).
- 22 Póvoa, M. M. *et al.* Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of Anopheles darlingi in Belém, Pará, Brazil. *Journal of medical entomology* **40**, 379-386 (2003).
- 23 da Costa, F. M., da Silva, A. R., da Graça Rosário, E. & Tadei, W. P. First record of Anopheles aquasalis associated with malaria transmission in a community in Buriticupu municipality, Maranhão state, Brazil. (2015).
- 24 Marrelli, M. T., Malafronte, R. S., Sallum, M. A. & Natal, D. Kerteszia subgenus of Anopheles associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. *Malaria journal* **6**, 127 (2007).
- 25 Laporta, G. Z., Ramos, D. G., Ribeiro, M. C. & Sallum, M. A. M. Habitat suitability of Anopheles vector species and association with human malaria in the Atlantic Forest in south-eastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **106**, 239-245 (2011).
- 26 Tadei, W. P. & Dutary Thatcher, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **42**, 87-94 (2000).
- 27 Tadei, W. P. *et al.* Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **59**, 325-335 (1998).

- 28 Foley, D. H. *et al.* Geographic distribution, evolution, and disease importance of species within the Neotropical *Anopheles albitarsis* Group (Diptera, Culicidae). *Journal of Vector Ecology* **39**, 168-181 (2014).
- 29 Zimmerman, R. H., Galardo, A. K. R., Lounibos, L. P., Arruda, M. & Wirtz, R. Bloodmeal hosts of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. *Journal of medical entomology* **43**, 947-956 (2006).
- 30 Conn, J. E. *et al.* Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **66**, 18-22 (2002).
- 31 Silva-Vasconcelos, A. d. *et al.* Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 151-161 (2002).
- 32 Póvoa, M. M. *et al.* The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **101**, 163-168 (2006).
- 33 Hiwat, H. & Bretas, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasites & vectors* **4**, 177 (2011).
- 34 Barros, F., Arruda, M., Gurgel, H. & Honorio, N. Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: the importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. *Bulletin of entomological research* **101**, 643-658 (2011).
- 35 Achee, N. L. *et al.* Use of remote sensing and geographic information systems to predict locations of *Anopheles darlingi*-positive breeding sites within the Sibun River in Belize, Central America. *Journal of medical entomology* **43**, 382-392 (2014).
- 36 Vittor, A. Y. *et al.* Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **81**, 5 (2009).
- 37 Zeilhofer, P., Dos Santos, E. S., Ribeiro, A. L., Miyazaki, R. D. & Dos Santos, M. A. Habitat suitability mapping of *Anopheles darlingi* in the surroundings of the Manso hydropower plant reservoir, Mato Grosso, Central Brazil. *International journal of health geographics* **6**, 7 (2007).
- 38 Moreno, J., Rubio-Palis, Y., Páez, E., Pérez, E. & Sánchez, V. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. *Medical and veterinary entomology* **21**, 339-349 (2007).

- 39 Rodrigures, M. S. *et al.* Change in Anopheles richness and composition in response to artificial flooding during the creation of the Jirau hydroelectric dam in Porto Velho, Brazil. *Malaria Journal* **16**, 87 (2017).
- 40 Gil, L. H. S., Tada, M. S., Katsuragawa, T. H., Ribolla, P. E. M. & Silva, L. H. P. d. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**, 271-276 (2007).
- 41 Sinka, M. E. *et al.* The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors* **3**, 117 (2010).
- 42 Coetzee, M., Craig, M. & Le Sueur, D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the Anopheles gambiae complex. *Parasitology today* **16**, 74-77 (2000).
- 43 Davidson, G. Anopheles gambiae complex. *Nature* **196**, 907 (1962).
- 44 Davidson, G. & Hunt, R. The crossing and chromosome characteristics of a new, sixth species in the Anopheles gambiae complex. *Parassitologia* **15**, 121-128 (1973).
- 45 Coetzee, M. *et al.* Anopheles coluzzii and Anopheles amharicus, new members of the Anopheles gambiae complex. *Zootaxa* **3619**, 246-274 (2013).
- 46 Oyewole, I. *et al.* Behaviour and population dynamics of the major anopheline vectors in a malaria endemic area in southern Nigeria. *Journal of vector borne diseases* **44**, 56 (2007).
- 47 Bayoh, M. & Lindsay, S. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of Anopheles gambiae sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Bulletin of entomological research* **93**, 375-381 (2003).
- 48 Minakawa, N., Sonye, G., Mogi, M. & Yan, G. Habitat characteristics of Anopheles gambiae ss larvae in a Kenyan highland. *Medical and veterinary entomology* **18**, 301-305 (2004).
- 49 Mutuku, F. M. *et al.* Pupal habitat productivity of Anopheles gambiae complex mosquitoes in a rural village in western Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **74**, 54-61 (2006).
- 50 Mwangangi, J. M. *et al.* Spatial distribution and habitat characterisation of Anopheles larvae along the Kenyan coast. *Journal of vector borne diseases* **44**, 44 (2007).
- 51 Tirados, I., Costantini, C., Gibson, G. & Torr, S. J. Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito Anopheles arabiensis: implications for vector control. *Medical and veterinary entomology* **20**, 425-437 (2006).

- 52 Govella, N. J., Chaki, P. P. & Killeen, G. F. Entomological surveillance of behavioural resilience and resistance in residual malaria vector populations. *Malaria Journal* **12**, 124 (2013).
- 53 Tirados I, C. C., Gibson G, Torr S. Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito *Anopheles arabiensis*: implications for vector control. *Med Vet Entomol* **20**, 425-437 (2006).
- 54 Muturi, E. J. *et al.* Environmental factors associated with the distribution of *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in a rice agro-ecosystem in Mwea, Kenya. *Journal of Vector Ecology* **33**, 56-64 (2008).
- 55 Mwangangi, J. M. *et al.* *Anopheles* larval abundance and diversity in three rice agro-village complexes Mwea irrigation scheme, central Kenya. *Malaria journal* **9**, 228 (2010).
- 56 Mwangangi, J. *et al.* Dynamics of immature stages of *Anopheles arabiensis* and other mosquito species (Diptera: Culicidae) in relation to rice cropping in a rice agro-ecosystem in Kenya. *Journal of Vector Ecology* **31**, 245-252 (2006).
- 57 Dia, I., Guelbeogo, M. W. & Ayala, D. Advances and Perspectives in the Study of the Malaria Mosquito *Anopheles funestus*. *Anopheles mosquitoes-New insights into malaria vectors* **10**, 55389 (2013).
- 58 Ogola, E. O. *et al.* Insights into malaria transmission among *Anopheles funestus* mosquitoes, Kenya. *Parasites & vectors* **11**, 577, doi:10.1186/s13071-018-3171-3 (2018).
- 59 Derua, Y. A., Alifrangis, M., Magesa, S. M., Kisinza, W. N. & Simonsen, P. E. Sibling species of the *Anopheles funestus* group, and their infection with malaria and lymphatic filarial parasites, in archived and newly collected specimens from northeastern Tanzania. *Malaria journal* **14**, 104, doi:10.1186/s12936-015-0616-4 (2015).
- 60 Kawada, H. *et al.* Reconsideration of *Anopheles rivulorum* as a vector of *Plasmodium falciparum* in Western Kenya: some evidence from biting time, blood preference, sporozoite positive rate, and pyrethroid resistance. *Parasites & vectors* **5**, 230 (2012).
- 61 Laurent, B. S. *et al.* Molecular characterization reveals diverse and unknown malaria vectors in the Western Kenyan highlands. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **94**, 327-335 (2016).
- 62 Okoye, P., Brooke, B., Hunt, R. & Coetzee, M. Relative developmental and reproductive fitness associated with pyrethroid resistance in the major southern

- African malaria vector, *Anopheles funestus*. *Bulletin of entomological research* **97**, 599-605 (2007).
- 63 Coetzee, M. & Fontenille, D. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect biochemistry and molecular biology* **34**, 599-605 (2004).
- 64 Carnevale, P. *et al.* Diversity of malaria in rice growing areas of the Afrotropical region. *Parassitologia* **41**, 273-276 (1999).
- 65 Sogoba, N. *et al.* Malaria transmission dynamics in Niono, Mali: the effect of the irrigation systems. *Acta tropica* **101**, 232-240 (2007).
- 66 Kitau, J. *et al.* Species shifts in the *Anopheles gambiae* complex: do LLINs successfully control *Anopheles arabiensis*? *PLoS One* **7**, e31481 (2012).
- 67 Athrey, G. *et al.* The effective population size of malaria mosquitoes: large impact of vector control. *PLoS genetics* **8**, e1003097 (2012).
- 68 Bayoh, M. N. *et al.* *Anopheles gambiae*: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza Province, Kenya. *Malar J* **9**, 62 (2010).
- 69 Mwangangi, J. M. *et al.* Shifts in malaria vector species composition and transmission dynamics along the Kenyan coast over the past 20 years. *Malaria journal* **12**, 13 (2013).
- 70 Russell, T. L. *et al.* Research Impact of promoting longer-lasting insecticide treatment of bed nets upon malaria transmission in a rural Tanzanian setting with pre-existing high coverage of untreated nets. *Malaria Journal* **9**, 187 (2010).
- 71 Derua, Y. A. *et al.* Change in composition of the *Anopheles gambiae* complex and its possible implications for the transmission of malaria and lymphatic filariasis in north-eastern Tanzania. *Malaria journal* **11**, 188 (2012).
- 72 Killeen, G. F. *et al.* Eliminating malaria vectors. *Parasit Vectors* **6**, 172 (2013).
- 73 Chinula, D. *et al.* Proportional decline of *Anopheles quadriannulatus* and increased contribution of *An. arabiensis* to the *An. gambiae* complex following introduction of indoor residual spraying with pirimiphos-methyl: an observational, retrospective secondary analysis of pre-existing data from south-east Zambia. *Parasites & vectors* **11**, 544 (2018).
- 74 Kiware, S. S. *et al.* Biologically meaningful coverage indicators for eliminating malaria transmission. *Biology letters* **8**, 874-877 (2012).
- 75 Kaindoa, E. W., Mkandawile, G., Ligamba, G., Kelly-Hope, L. A. & Okumu, F. O. Correlations between household occupancy and malaria vector biting risk in rural

- Tanzanian villages: implications for high-resolution spatial targeting of control interventions. *Malaria Journal* **15**, 1 (2016).
- 76 Kaindoa, E. W. *et al.* Interventions that effectively target *Anopheles funestus* mosquitoes could significantly improve control of persistent malaria transmission in south–eastern Tanzania. *PLoS One* **12**, e0177807, doi:10.1371/journal.pone.0177807 (2017).
- 77 Lwetoijera, D. W. *et al.* Increasing role of *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in malaria transmission in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malar J* **13**, 331 (2014).
- 78 Organization, W. H. *Guidelines for Malaria Vector Control*. (World Health Organization, 2019).
- 79 Bhatt, S. *et al.* The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**, 207-211 (2015).
- 80 Killeen, G. F. *et al.* Measuring, manipulating and exploiting behaviours of adult mosquitoes to optimise malaria vector control impact. *BMJ Global Health* **2**, doi:10.1136/bmjgh-2016-000212 (2017).
- 81 Hawley, W. A. *et al.* Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **68**, 121-127 (2003).
- 82 Govella, N. J., Okumu, F. O. & Killeen, G. F. Insecticide-treated nets can reduce malaria transmission by mosquitoes which feed outdoors. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **82**, 415-419 (2010).
- 83 Zaim, M., Aitio, A. & Nakashima, N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and veterinary entomology* **14**, 1-5 (2000).
- 84 Ranson, H. *et al.* Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* **27**, doi:10.1016/j.pt.2010.08.004 (2011).
- 85 Jones, C. M. *et al.* The dynamics of pyrethroid resistance in *Anopheles arabiensis* from Zanzibar and an assessment of the underlying genetic basis. *Parasites & vectors* **6**, 343 (2013).
- 86 Koudou, B. G., Koffi, A. A., Malone, D. & Hemingway, J. Efficacy of PermaNet® 2.0 and PermaNet® 3.0 against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* in experimental huts in Côte d'Ivoire. *Malaria journal* **10**, 172 (2011).

- 87 Corbel, V. *et al.* Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet® 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study in Western and Central Africa. *Malaria journal* **9**, 113 (2010).
- 88 Pennetier, C. *et al.* Efficacy of Olyset® Plus, a new long-lasting insecticidal net incorporating permethrin and piperonil-butoxide against multi-resistant malaria vectors. *PLoS One* **8**, e75134 (2013).
- 89 Organization, W. H. *Indoor Residual Spraying: An operational manual for indoor residual spraying (IRS) for malaria transmission control and elimination.* (World Health Organization, 2015).
- 90 Baia-da-Silva, D. C. *et al.* Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **52** (2019).
- 91 Tukei, B. B., Beke, A. & Lamadrid-Figueroa, H. Assessing the effect of indoor residual spraying (IRS) on malaria morbidity in Northern Uganda: a before and after study. *Malaria journal* **16**, 4 (2017).
- 92 Kanyangarara, M. *et al.* Reduction in malaria incidence following indoor residual spraying with Actellic 300 CS in a setting with pyrethroid resistance: Mutasa District, Zimbabwe. *PLoS One* **11**, e0151971 (2016).
- 93 Hast, M. A. *et al.* The impact of three years of targeted IRS with pirimiphos-methyl on malaria parasite prevalence in a high-transmission area of northern Zambia. *American journal of epidemiology* (2019).
- 94 Coleman, S. *et al.* A reduction in malaria transmission intensity in Northern Ghana after 7 years of indoor residual spraying. *Malaria journal* **16**, 324 (2017).
- 95 Kim, D., Fedak, K. & Kramer, R. Reduction of malaria prevalence by indoor residual spraying: a meta-regression analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **87**, 117-124 (2012).
- 96 Ogoma, S. B. *et al.* Screening mosquito house entry points as a potential method for integrated control of endophagic filariasis, arbovirus and malaria vectors. *PLoS neglected tropical diseases* **4**, e773 (2010).
- 97 Williams, Y. A. *et al.* Expanding the vector control toolbox for malaria elimination: a systematic review of the evidence. *Adv Parasitol* **99**, doi:10.1016/bs.apar.2018.01.003 (2018).
- 98 Saúde, M. d. *Guia para Gestão Local do Controle da Malária: Controle Vetorial.* Vol. 2 (2009).
- 99 Organization, W. H. *Space spray application of insecticides for vector and public health pest control: a practitioner's guide.* (Geneva: World Health Organization, 2003).

- 100 Moore, S. J. A new perspective on the application of mosquito repellents. *Lancet Infect Dis.* **16**, doi:10.1016/s1473-3099(16)30207-9 (2016).
- 101 Maia, M. F. *et al.* Do topical repellents divert mosquitoes within a community? Health equity implications of topical repellents as a mosquito bite prevention tool. *PLoS One* **8**, doi:10.1371/journal.pone.0084875 (2013).
- 102 Mmbando, A. S. *et al.* Eave ribbons treated with the spatial repellent, transfluthrin, can effectively protect against indoor-biting and outdoor-biting malaria mosquitoes. *Malaria journal* **17**, 368 (2018).
- 103 Ogoma, S. B. *et al.* Spatial repellency of transfluthrin-treated hessian strips against laboratory-reared *Anopheles arabiensis* mosquitoes in a semi-field tunnel cage. *Parasit Vectors.* **5**, doi:10.1186/1756-3305-5-54 (2012).
- 104 Ogoma, S. B. *et al.* A low technology emanator treated with the volatile pyrethroid transfluthrin confers long term protection against outdoor biting vectors of lymphatic filariasis, arboviruses and malaria. *PLoS Negl Trop Dis.* **11**, doi:10.1371/journal.pntd.0005455 (2017).
- 105 Masalu, J. P. *et al.* Efficacy and user acceptability of transfluthrin-treated sisal and hessian decorations for protecting against mosquito bites in outdoor bars. *Parasites & vectors* **10**, 197 (2017).
- 106 Consoli, R. A. & Oliveira, R. L. d. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.* (Editora Fiocruz, 1994).
- 107 Service, M. W. in *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods* (Elsevier applied Science, 1993).
- 108 Charlwood, J. *et al.* Studies on the resting behaviour and host choice of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* from Muleba, Tanzania. *Medical and veterinary entomology* **32**, 263-270 (2018).
- 109 Maia, M. F. *et al.* Comparison of the CDC Backpack aspirator and the Prokopack aspirator for sampling indoor-and outdoor-resting mosquitoes in southern Tanzania. *Parasites & vectors* **4**, 124 (2011).
- 110 Mathenge, E. M. *et al.* Comparative field evaluation of the Mbita trap, the Centers for Disease Control light trap, and the human landing catch for sampling of malaria vectors in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **70** (2004).
- 111 Govella, N. J., Chaki, P. P., Mpanjile, J. M. & Killeen, G. F. Monitoring mosquitoes in urban Dar es Salaam: evaluation of resting boxes, window exit traps, CDC light traps, Ifakara tent traps and human landing catches. *Parasites & vectors* **4**, 40 (2011).

- 112 Hiwat, H., Andriessen, R., Rijk, M. d., Koenraadt, C. J. M. & Takken, W. Carbon dioxide baited trap catches do not correlate with human landing collections of *Anopheles aquasalis* in Suriname. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **106**, 360-364 (2011).
- 113 WHO. Manual on Practical Entomology in Malaria - Methods and Techniques. 230 (World Health Organization, Geneva, 1975).
- 114 Detinova, T. S. in *Age-grouping methods in Diptera of medical importance, with special reference to some vectors of malaria* (World Health Organization, 1962).
- 115 Dis, J. V. B. Life table analysis of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in relation to malaria transmission. *J Vector Borne Dis* **46**, 295-298 (2009).
- 116 Collins, E. *et al.* The relationship between insecticide resistance, mosquito age and malaria prevalence in *Anopheles gambiae* sl from Guinea. *Scientific reports* **9**, 8846 (2019).
- 117 Glunt, K. D., Thomas, M. B. & Read, A. F. The effects of age, exposure history and malaria infection on the susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to low concentrations of pyrethroid. *PLoS One* **6**, e24968 (2011).
- 118 Jones, C. M. *et al.* Aging partially restores the efficacy of malaria vector control in insecticide-resistant populations of *Anopheles gambiae* sl. from Burkina Faso. *Malaria journal* **11**, 24 (2012).
- 119 Hiwat, H., De Rijk, M., Andriessen, R., Koenraadt, C. & Takken, W. Evaluation of methods for sampling the malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae) in Suriname and the relation with its biting behavior. *Journal of medical entomology* **48**, 1039-1046 (2011).
- 120 Duo-Quan, W. *et al.* Comparative evaluation of light-trap catches, electric motor mosquito catches and human biting catches of *Anopheles* in the Three Gorges Reservoir. *PLoS One* **7**, e28988 (2012).
- 121 Mathenge, E. *et al.* Development of an exposure-free bednet trap for sampling Afrotropical malaria vectors. *Med Vet Entomol* **16**, doi:10.1046/j.0269-283x.2002.00350.x (2002).
- 122 Govella, N. J. *et al.* A new tent trap for sampling exophagic and endophagic members of the *Anopheles gambiae* complex. *Malaria journal* **8**, 157 (2009).
- 123 Stoops, C. A. *et al.* Laboratory and field testing of bednet traps for mosquito (Diptera: Culicidae) sampling in West Java, Indonesia. *Journal of Vector Ecology* **35**, 187-196 (2010).

- 124 Tangena, J.-A. A., Thammavong, P., Hiscox, A., Lindsay, S. W. & Brey, P. T. The human-baited double net trap: an alternative to human landing catches for collecting outdoor biting mosquitoes in Lao PDR. *PLoS One* **10**, e0138735 (2015).
- 125 Lima, J. B. P., Galardo, A. K. R., Bastos, L. S., da Silva Lima, A. W. & Rosa-Freitas, M. G. MosqTent: An individual portable protective double-chamber mosquito trap for anthropophilic mosquitoes. *PLoS neglected tropical diseases* **11**, e0005245 (2017).
- 126 Krajacich, B. J. *et al.* Design and testing of a novel, protective human-baited tent trap for the collection of anthropophilic disease vectors. *Journal of medical entomology* **51**, 253-263 (2014).
- 127 Qiu, Y., Smallegange, R., Van Loon, J., Ter Braak, C. & Takken, W. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* ss. *Medical and veterinary entomology* **20**, 280-287 (2006).
- 128 Gama, R. A., Silva, I. M., Geier, M. & Eiras, A. E. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**, doi:10.1590/0074-0276108062013013 (2013).
- 129 Maliti, D. V. *et al.* Development and evaluation of mosquito-electrocuting traps as alternatives to the human landing catch technique for sampling host-seeking malaria vectors. *Malaria journal* **14**, 502 (2015).
- 130 Rubio-Palis, Y. *et al.* Can Mosquito Magnet® substitute for human-landing catches to sample anopheline populations? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**, 546-549 (2012).
- 131 Kline, D. L. Comparison of two American biophysics mosquito traps: The professional and a new counterflow geometry trap. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News* **15**, 276-282 (1999).
- 132 Kroeckel, U., Rose, A., Eiras, Á. E. & Geier, M. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: Comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association* **22**, 229-238 (2006).
- 133 Okumu, F. O., Madumla, E. P., John, A. N., Lwetoijera, D. W. & Sumaye, R. D. Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations-the Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasit Vectors*. **3**, doi:10.1186/1756-3305-3-12 (2010).
- 134 Matowo, N. S. *et al.* Using a new odour-baited device to explore options for luring and killing outdoor-biting malaria vectors: a report on design and field evaluation of the Mosquito Landing Box. *Parasit Vectors*. **6**, doi:10.1186/1756-3305-6-137 (2013).

- 135 Hiscox, A. *et al.* Development and optimization of the Suna trap as a tool for mosquito monitoring and control. *Malaria journal* **13**, 257 (2014).
- 136 Lima, J. B. P., Rosa-Freitas, M. G., Rodvalho, C. M., Santos, F. & Lourenço-de-Oliveira, R. Is there an efficient trap or collection method for sampling *Anopheles darlingi* and other malaria vectors that can describe the essential parameters affecting transmission dynamics as effectively as human landing catches?-A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **109**, 685-705 (2014).
- 137 Rodrigues, M. S., Silva, I. M., Leal, L. B., Dos Santos Jr, C. A. & Eiras, Á. E. Development of a New Mosquito Retention System for the BG-Malaria Trap To Reduce The Damage To Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* **30**, 184-190 (2014).
- 138 Leal, L. B. Armadilha BG-Malária: avaliação do efeito da temperatura e da adição de suor humano na captura de anofelinos, com ênfase em *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae). (2014).
- 139 Rodrigues, M. d. S. *Aprimoramento e avaliação da eficiência de protótipos da armadilha BG-Malária para a captura de adultos de Anopheles darlingi*, Universidade Federal de Minas Gerais, (2013).
- 140 Eiras, A. E. & Jepson, P. Responses of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to host odours and convection currents using an olfactometer bioassay. *Bulletin of entomological research* **84**, 207-211 (1994).
- 141 Hawkes, F. & Gibson, G. Seeing is believing: the nocturnal malarial mosquito *Anopheles coluzzii* responds to visual host-cues when odour indicates a host is nearby. *Parasites & vectors* **9**, 320 (2016).
- 142 Cardé, R. T. & Gibson, G. Host finding by female mosquitoes: mechanisms of orientation to host odours and other cues. *Olfaction in vector-host interactions* **2010**, 115-142 (2010).
- 143 Takken, W. & Knols, B. G. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol* **44**, doi:10.1146/annurev.ento.44.1.131 (1999).
- 144 Bowen, M. The sensory physiology of host-seeking behavior in mosquitoes. *Annual review of entomology* **36**, 139-158 (1991).
- 145 Murlis, J., Elkinton, J. S. & Carde, R. T. Odor plumes and how insects use them. *Annual review of entomology* **37**, 505-532 (1992).
- 146 Bernier, U. R., Kline, D. L., Barnard, D. R., Schreck, C. E. & Yost, R. A. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification

- of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Analytical Chemistry* **72**, 747-756 (2000).
- 147 Curran, A. M., Rabin, S. I., Prada, P. A. & Furton, K. G. Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. *Journal of chemical ecology* **31**, 1607-1619 (2005).
- 148 Smallegange, R. C. *et al.* Malaria infected mosquitoes express enhanced attraction to human odor. *PLoS One* **8**, e63602 (2013).
- 149 Smallegange, R. C. & Takken, W. Host-seeking behaviour of mosquitoes: responses to olfactory stimuli in the laboratory. *Olfaction in vector-host interactions* **2**, 143-180 (2010).
- 150 Vilela, E. F. & Della Lucia, T. M. C. *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas.* (Editora Holos, 2001).
- 151 Eiras, A. E. & Jepson, P. C. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bulletin of entomological research* **81**, 151-160 (1991).
- 152 Geier, M., Bosch, O. J. & Boeckh, J. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chemical senses* **24**, 647-653 (1999).
- 153 Mukabana, W. R., Takken, W., Coe, R. & Knols, B. G. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria journal* **1**, 17 (2002).
- 154 Dekker, T., Geier, M. & Cardé, R. T. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *Journal of Experimental Biology* **208**, 2963-2972 (2005).
- 155 Smallegange, R. C., Qiu, Y. T., van Loon, J. J. & Takken, W. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Chemical senses* **30**, 145-152 (2005).
- 156 Williams, C. R., Long, S. A., Russell, R. C. & Ritchie, S. A. Field efficacy of the BG-Sentinel compared with CDC Backpack Aspirators and CO₂-baited EVS traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association* **22**, 296-300 (2006).
- 157 Spitzen, J., Smallegange, R. C. & Takken, W. Effect of human odours and positioning of CO₂ release point on trap catches of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* in an olfactometer. *Physiological Entomology* **33**, 116-122 (2008).

- 158 Van Thiel, P. On zoophilism and anthropophilism of *Anopheles* biotypes and species. *Rivista di Malariologia* (1939).
- 159 Reeves, W. Quantitative Field Studies on a Carbon Dioxide Chemotropism of Mosquitoes¹. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **2**, 325-331 (1953).
- 160 Mboera, L. & Takken, W. Carbon dioxide chemotropism in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and its potential in vector surveillance and management programmes. *Medical and veterinary entomology* **7**, 355-368 (1997).
- 161 EIRAS, A. & JEPSON, P. in *Techniques in Plant-Insect Interactions and Biopescides. Santiago: Proceedings of an IFS Workshop in Chemical Ecology*. 185-189.
- 162 CARESTÍA, R. R. & SAVAGE, L. B. Effectiveness of carbon dioxide as a mosquito attractant in the CDC miniature light trap. *Mosquito News* **27** (1967).
- 163 Takken, W. & Kline, D. Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants. *Journal of the American Mosquito Control Association* **5**, 311-316 (1989).
- 164 Njiru, B. N., Mukabana, W. R., Takken, W. & Knols, B. G. Trapping of the malaria vector *Anopheles gambiae* with odour-baited MM-X traps in semi-field conditions in western Kenya. *Malaria journal* **5**, 39 (2006).
- 165 Qiu, Y. T. *et al.* Attractiveness of MM-X traps baited with human or synthetic odor to mosquitoes (Diptera: Culicidae) in The Gambia. *Journal of medical entomology* **44**, 970-983 (2007).
- 166 Schmied, W. H., Takken, W., Killeen, G. F., Knols, B. G. & Smallegange, R. C. Evaluation of two counterflow traps for testing behaviour-mediating compounds for the malaria vector *Anopheles gambiae* ss under semi-field conditions in Tanzania. *Malaria Journal* **7**, 230 (2008).
- 167 Cooper, R., Frances, S., Popat, S. & Waterson, D. The effectiveness of light, 1-octen-3-ol, and carbon dioxide as attractants for anopheline mosquitoes in Madang Province, Papua New Guinea. *Journal of the American Mosquito Control Association* **20**, 239-242 (2004).
- 168 Pombi, M. *et al.* Field evaluation of a novel synthetic odour blend and of the synergistic role of carbon dioxide for sampling host-seeking *Aedes albopictus* adults in Rome, Italy. *Parasites & vectors* **7**, 1-5 (2014).
- 169 Smallegange, R. C., Qiu, Y. T., Bukovinszkiné-Kiss, G., Van Loon, J. J. & Takken, W. The effect of aliphatic carboxylic acids on olfaction-based host-seeking of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Journal of chemical ecology* **35**, 933 (2009).

- 170 Mboera, L., Takken, W. & Sambu, E. The response of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to traps baited with carbon dioxide, 1-octen-3-ol, acetone, butyric acid and human foot odour in Tanzania. *Bulletin of entomological research* **90**, 155-159 (2000).
- 171 Vythilingam, I., Lian, C. G. & Thim, C. S. Evaluation of carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **23**, 328-331 (1992).
- 172 Cork, A. & Park, K. Identification of electrophysiologically-active compounds for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, in human sweat extracts. *Medical and veterinary entomology* **10**, 269-276 (1996).
- 173 Mukabana, W. R. *et al.* A novel synthetic odorant blend for trapping of malaria and other African mosquito species. *Journal of Chemical Ecology* **38**, 235-244 (2012).
- 174 Okumu, F. O. *et al.* Development and field evaluation of a synthetic mosquito lure that is more attractive than humans. *PLoS One* **5**, doi:10.1371/journal.pone.0008951 (2010).
- 175 Smallegange, R. C., Knols, B. G. & Takken, W. Effectiveness of synthetic versus natural human volatiles as attractants for *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) sensu stricto. *Journal of medical entomology* **47**, 338-344 (2010).
- 176 Verhulst, N. O. *et al.* Improvement of a synthetic lure for *Anopheles gambiae* using compounds produced by human skin microbiota. *Malaria Journal* **10**, 1 (2011).
- 177 Heuskin, S., Verheggen, F. J., Haubruge, E., Wathelet, J.-P. & Lognay, G. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *BASE* (2011).
- 178 Torr, S., Hall, D., Phelps, R. & Vale, G. Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research* **87**, 299-311 (1997).
- 179 Johansson, B. G. *et al.* Release rates for pine sawfly pheromones from two types of dispensers and phenology of *Neodiprion sertifer*. *Journal of chemical ecology* **27**, 733-745 (2001).
- 180 Tomaszewska, E. *et al.* Evaluation of pheromone release from commercial mating disruption dispensers. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 2399-2405 (2005).
- 181 McDonough, L. M. (ACS Publications, 1991).
- 182 Butler, L. & McDonough, L. Insect sex pheromones: evaporation rates of alcohols and acetates from natural rubber septa. *Journal of chemical ecology* **7**, 627-633 (1981).

- 183 Kehat, M., Anshelevich, L., Dunkelblum, E., Fraishtat, P. & Greenberg, S. Sex pheromone traps for monitoring the codling moth: effect of dispenser type, field aging of dispenser, pheromone dose and type of trap on male captures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **70**, 55-62 (1994).
- 184 Lopez, J., Leonhardt, B. & Shaver, T. Performance criteria and specifications for laminated plastic sex pheromone dispenser for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of chemical ecology* **17**, 2293-2305 (1991).
- 185 Golub, M., Weatherston, J. & Benn, M. Measurement of release rates of gossyplure from controlled release formulations by mini-airflow method. *Journal of chemical ecology* **9**, 323-333 (1983).
- 186 Munoz-Pallares, J., Corma, A., Primo, J. & Primo-Yufera, E. Zeolites as pheromone dispensers. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 4801-4807 (2001).
- 187 Atterholt, C., Delwiche, M., Rice, R. & Krochta, J. Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. *Journal of Controlled Release* **57**, 233-247 (1999).
- 188 Mukabana, W. R. *et al.* Evaluation of low density polyethylene and nylon for delivery of synthetic mosquito attractants. *Parasites & Vectors* **5**, 202 (2012).
- 189 Jawara, M. *et al.* Field testing of different chemical combinations as odour baits for trapping wild mosquitoes in The Gambia. *PLoS One* **6**, e19676 (2011).
- 190 Okumu, F. *et al.* Using nylon strips to dispense mosquito attractants for sampling the malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Journal of Medical Entomology* **47**, 274-282 (2010).
- 191 Mweresa, C. K. *et al.* Evaluation of textile substrates for dispensing synthetic attractants for malaria mosquitoes. *Parasite Vectors* **7**, 376 (2014).
- 192 Mweresa, C. K. *et al.* Understanding the long-lasting attraction of malaria mosquitoes to odor baits. *PloS one* **10**, e0121533 (2015).
- 193 Mweresa, C. K. *et al.* Enhancing attraction of African malaria vectors to a synthetic odor blend. *Journal of Chemical Ecology* **42**, 508-516, doi:10.1007/s10886-016-0711-1 (2016).
- 194 WHO. *World Malaria Report*. (World Health Organization, 2017).
- 195 IHI. *Ifakara Health Institute*, <<http://ihi.or.tz>> (2019).
- 196 Matowo, N. S. *et al.* Combining Synthetic Human Odours and Low-Cost Electrocuting Grids to Attract and Kill Outdoor-Biting Mosquitoes: Field and Semi-Field Evaluation of an Improved Mosquito Landing Box. *PloS one* **11** (2016).

- 197 Ngowo, H. S., Kaindoa, E. W., Matthiopoulos, J., Ferguson, H. M. & Okumu, F. O. Variations in household microclimate affect outdoor-biting behaviour of malaria vectors. *Wellcome open research* **2** (2017).
- 198 Camargo, L. M. A. *et al.* Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, western Amazon region): seasonal variation and risk groups in an urban locality. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **55**, 32-38 (1996).
- 199 Braga, E. M., Carvalho, L. H., Fontes, C. J. & Krettli, A. U. Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **66**, 299-303 (2002).
- 200 Brasil, M. d. S. d. *SIVEP-Malária*, <http://www.saude.gov.br/sivep_malaria> (2019).
- 201 Mweresa, C. K. *et al.* Molasses as a source of carbon dioxide for attracting the malaria mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Malaria Journal* **13**, 160 (2014).
- 202 Moshi, I. R. *et al.* Community perceptions on outdoor malaria transmission in Kilombero Valley, Southern Tanzania. *Malar J.* **16**, doi:10.1186/s12936-017-1924-7 (2017).
- 203 Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015, URL [http. www.R-project.org](http://www.R-project.org) (2016).
- 204 Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* **67**, doi:10.18637/jss.v067.i01 (2015).
- 205 WHO. *Global technical strategy for malaria 2016-2030*. (World Health Organization, 2015).
- 206 Russell, T. L., Beebe, N. W., Cooper, R. D., Lobo, N. F. & Burkot, T. R. Successful malaria elimination strategies require interventions that target changing vector behaviours. *Malaria journal* **12**, 56 (2013).
- 207 Hoel, D. F. *et al.* Optimizing Collection of *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) in Biogents Sentinel Traps. *Journal of Medical Entomology* **51**, 1268-1275 (2014).
- 208 Busula, A. O. *et al.* Mosquito host preferences affect their response to synthetic and natural odour blends. *Malaria Journal* **14**, 133 (2015).
- 209 Verhulst, N. O., Bakker, J. W. & Hiscox, A. Modification of the Suna Trap for Improved Survival and Quality of Mosquitoes in Support of Epidemiological Studies. *Journal of the American Mosquito Control Association* **31**, 223-232 (2015).

- 210 McCann, R. S. *et al.* Reemergence of *Anopheles funestus* as a vector of *Plasmodium falciparum* in western Kenya after long-term implementation of insecticide-treated bed nets. *Am J Trop Med Hyg* **90**, doi:10.4269/ajtmh.13-0614 (2014).
- 211 Dekker, T. & TAKKEN, W. Differential responses of mosquito sibling species *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* to carbon dioxide, a man or a calf. *Medical and veterinary entomology* **12**, 136-140 (1998).
- 212 Jones, J. W. *et al.* Seasonal distribution, biology, and human attraction patterns of culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a forest near Puerto Almendras, Iquitos, Peru. *Journal of medical entomology* **41**, 349-360 (2004).
- 213 Brown, H. E. *et al.* Effectiveness of mosquito traps in measuring species abundance and composition. *Journal of medical entomology* **45**, 517-521 (2008).
- 214 Guerenstein, P., Lorenzo, M., Núñez, J. & Lazzari, C. Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. *Experientia* **51**, 834-837 (1995).
- 215 Saitoh, Y. *et al.* Yeast-generated CO₂ as a convenient source of carbon dioxide for adult mosquito sampling. *Journal of the American Mosquito Control Association* **20**, 261-264 (2004).
- 216 Oli, K., Jeffery, J. & Vythilingam, I. Research Note: A comparative study of adult mosquito trapping using dry ice and yeast generated carbon dioxide. *Trop Biomed* **22**, 249-251 (2005).
- 217 Smallegange, R. C. *et al.* Sugar-fermenting yeast as an organic source of carbon dioxide to attract the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal* **9**, 292 (2010).
- 218 Sukumaran, D. *et al.* Application of biogenic carbon dioxide produced by yeast with different carbon sources for attraction of mosquitoes towards adult mosquito traps. *Parasitology research* **115**, 1453-1462, doi:10.1007/s00436-015-4879-z (2016).
- 219 Mmbando, A. S. *et al.* Effects of a new outdoor mosquito control device, the mosquito landing box, on densities and survival of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, inside controlled semi-field settings. *Malar J.* **14**, doi:10.1186/s12936-015-1013-8 (2015).
- 220 Menger, D., Van Loon, J. & Takken, W. Assessing the efficacy of candidate mosquito repellents against the background of an attractive source that mimics a human host. *Medical and Veterinary Entomology* **28**, 407-413 (2014).
- 221 Van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A. & Pronk, J. T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van leeuwenhoek* **63**, 343-352 (1993).

- 222 SOARES, T. L., Ferreira SILVA, C. & Freitas SCHWAN, R. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **31** (2011).
- 223 Dekker, T. *et al.* Selection of biting sites on a human host by *Anopheles gambiae* ss, *An. arabiensis* and *An. quadriannulatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **87**, 295-300 (1998).
- 224 Braack, L. *et al.* Biting behaviour of African malaria vectors: 1. where do the main vector species bite on the human body? *Parasites & vectors* **8**, 76 (2015).
- 225 Mmbando, A. S. *et al.* Small-scale field evaluation of push-pull system against early- and outdoor-biting malaria mosquitoes in an area of high pyrethroid resistance in Tanzania. *Wellcome Open Res* **2**, doi:10.12688/wellcomeopenres.13006.1 (2017).
- 226 Ogoma, S. B. *et al.* The mode of action of spatial repellents and their impact on vectorial capacity of *Anopheles gambiae sensu stricto*. *PLoS One* **9**, doi:10.1371/journal.pone.0110433 (2014).
- 227 Menger, D. J. *et al.* Field evaluation of a push-pull system to reduce malaria transmission. *PLoS One* **10**, doi:10.1371/journal.pone.0123415 (2015).

APÊNDICE

- 1 Lista de espécies da subfamília Culicinae capturadas durante o período do estudo, em campo no Ramal Brasileirinho, região periurbana de Manaus – AM.

Lista de espécies da subfamília Culicinae capturadas durante o período do estudo

Espécie	Quantidade	Proporção	Método	Atraente	Liberador	Local
<i>Culex</i> spp.	1435	65%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	2276	69,8%	BG-malária	Mbita Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	2694	63,8%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	935	81,5%	BG-malária	Mbita Blend	BG-Cartridge	Brasil
	544	75,8%	BG-malária	Ifakara Blend	BG-Cartridge	Brasil
	409	75,6%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
<i>Mansonia</i> spp.	296	13,4%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	565	17,3%	BG-malária	Mbita Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	848	20,1%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	72	6,3%	BG-malária	Mbita Blend	BG-Cartridge	Brasil
	58	8,1%	BG-malária	Ifakara Blend	BG-Cartridge	Brasil
	54	10,0%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
<i>Aedes</i> spp.	4	0,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	3	0,1%	BG-malária	Mbita Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	13	0,3%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	7	1,0%	BG-malária	Ifakara Blend	BG-Cartridge	Brasil
	1	0,2%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
<i>Coquillettidia</i> spp.	1	0,02%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	271	12,3%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	123	3,8%	BG-malária	Mbita Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	453	10,7%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melação	Brasil
	69	6,0%	BG-malária	Mbita Blend	BG-Cartridge	Brasil
	12	1,7%	BG-malária	Ifakara Blend	BG-Cartridge	Brasil
	34	6,3%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil

Lista de espécies da subfamília Culicinae capturadas durante o período do estudo

<i>Psorophora albipes</i>	31	92,7%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
	29	0,9%	BG-malária	Mbita Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
	21	0,5%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
	7	0,6%	BG-malária	Mbita Blend	BG-Cartridge	Brasil
	7	1,0%	BG-malária	Ifakara Blend	BG-Cartridge	Brasil
	14	2,6%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
<i>Limatus durhami</i>	1	0,02%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
<i>Sabethes</i> sp.	1	0,02%	BG-malária	CO2	<i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
<i>Culex</i> spp.	173	94,1%	BG-malária	Controle	Controle	Tanzânia
	2641	79,9%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Tanzânia
	2770	78,6%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Tanzânia
	3137	91,9%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Tanzânia
	889	77,5%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
	1163	60,5%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
	2239	55,5%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
	2426	62,1%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	UFMG/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
	2118	69,9%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
	<i>Mansonia</i> spp.	2	1,1%	BG-malária	Controle	Controle
222		6,7%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Tanzânia
108		3,1%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Tanzânia
69		2,0%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Tanzânia
81		7,1%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
309		16,1%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil
622		15,4%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisiae</i> + melão	Brasil

Lista de espécies da subfamília Culicinae capturadas durante o período do estudo

	471	12,1%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	UFMG/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	366	12,1%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
<i>Aedes</i> spp.	6	0,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Tanzânia
	1	0,03%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Tanzânia
	6	0,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Tanzânia
	1	0,1%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
	4	0,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	1	0,02%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	3	0,1%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	UFMG/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	6	0,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
<i>Coquillettidia</i> spp.	5	0,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Tanzânia
	4	0,1%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Tanzânia
	7	0,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Tanzânia
	1	0,03%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	UFMG/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	118	10,3%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
	254	13,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	251	6,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	624	16,0%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	UFMG/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	157	5,2%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
<i>Psorophora albipes</i>	29	2,5%	BG-malária	Controle	Controle	Brasil
	19	1,0%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Cartridge/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	34	0,8%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	BG-Sachet/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	16	0,4%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	UFMG/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil
	28	0,9%	BG-malária	Ifakara Blend + CO2	Tiras de nylon/ <i>S. cerevisae</i> + melação	Brasil

ANEXOS

- 1** Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pelos Comitê de Ética do Ifakara Health Institute (IHI/IRB/No: 34–2014) e Coordenação do Conselho de Pesquisa Médica do Instituto Nacional de Pesquisa Médica da Tanzânia (Certificado N°. NIMR/HQ/R.8a/Vol.IX/1903).

- 2** Peres AM, Eiras AE, **Batista EPA**. Membrana polimérica, processo de fabricação, dispositivo e uso para liberação controlada de atraentes ou repelentes para insetos. 2019. Patente: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020190110783, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 29/05/2019.

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
P O BOX 78373 DAR ES SALAAM, TANZANIA
Tel +255 (0) 22 2774714, Fax: + 255 (0) 22 2771714 Email: irb@ihi.or.tz

8th September 2014

National Institute for Medical Research
P O Box 9653
Dar Es Salaam
Email: headquarters@nimr.or.tz

Halfan S. Ngowo,
Ifakara Health Institute
P O Box 53
Ifakara

IHI/IRB/No: 34-2014

INSTITUTIONAL CLEARANCE CERTIFICATE FOR CONDUCTING HEALTH RESEARCH

On 05th September 2014, the Ifakara Health Institute Review Board (IHI-IRB) reviewed from study titled: *"Targeting residual malaria vectors in communities where insecticidal bednets are already widely used"* submitted by Co-Principal Investigator Halfan S. Ngowo.

The following documents were reviewed:

1. Protocol
2. Informed Consent Forms
3. Budget
4. Tools
5. CVs


The study has been approved for implementation after IRB consensus. This certificate thus indicates that the above-mentioned study has been granted an Institutional Ethics Clearance to conduct the above named study in Ulanga, Kilombero and Rufiji districts.

The Principal Investigator of the study must ensure that, the following conditions are fulfilled during or after the implementation of the study:

1. PI should submit a six month progress report and the final report at the end of the project
2. Any amendment, which will be done after the approval of the protocol, must be communicated as soon as possible to the IRB for another approval
3. All research must stop after the project expiration date, unless there is prior information and justification to the IRB.
4. There should be plans to give feedback to the community on the findings
5. Any publication needs to pass through the IRB
6. The approval is valid until 05th September 2015

The IRB reserves the right to undertake field inspections to check on the protocol compliance


Deputy Chairperson
Dr Saidi Mpendu


Deputy IRB Secretary
Dr Mwifadhi Mrisho

Dar es Salaam
PO Box 78373
Tel: 022 2774756
Fax: 022 2771714

Ifakara
PO Box 63
Tel: 0232 625164
Fax: 0232 625312

Bagamoyo
PO Box 74
Tel: 0232 440065
Fax: 0232 440064

Rufiji
PO Box 40 Ikwiliini
Tel: 0787 384521
Fax: 0232 010001

Mtwara
PO Box 1048
Tel: 0232 333487

Kigoma
PO Box 1077
Tel: 0282 803655



THE UNITED REPUBLIC OF
TANZANIA



National Institute for Medical Research
P.O. Box 9653
Dar es Salaam
Tel: 255 22 2121400/390
Fax: 255 22 2121380/2121360
E-mail: headquarters@nimr.or.tz
NIMR/HQ/R.8a/Vol. IX/1903

Ministry of Health and Social Welfare
P.O. Box 9083
Dar es Salaam
Tel: 255 22 2120262-7
Fax: 255 22 2110986

11th February 2015

Mr Halfan S Ngowo
Ifakara Health Institute
P O Box 53, IFAKARA, MOROGORO

**CLEARANCE CERTIFICATE FOR CONDUCTING
MEDICAL RESEARCH IN TANZANIA**

This is to certify that the research entitled: Targeting residual malaria vectors in communities where insecticide bed nets are already widely used in Tanzania, (Ngowo H S *et al*), has been granted ethical clearance to be conducted in Tanzania.

The Principal Investigator of the study must ensure that the following conditions are fulfilled:

1. Progress report is submitted to the Ministry of Health and the National Institute for Medical Research, Regional and District Medical Officers after every six months.
2. Permission to publish the results is obtained from National Institute for Medical Research.
3. Copies of final publications are made available to the Ministry of Health & Social Welfare and the National Institute for Medical Research.
4. Any researcher, who contravenes or fails to comply with these conditions, shall be guilty of an offence and shall be liable on conviction to a fine. NIMR Act No. 23 of 1979, PART III Section 10(2).
5. Sites: Ulanga, Kilombero and Rufiji Districts.

Approval is for one year: 11th February 2015 to 10th February 2016.

Name: Dr Mwelecele N Malecela

Signature
CHAIRPERSON
MEDICAL RESEARCH
COORDINATING COMMITTEE

Name: Dr Margaret E Mhando

Signature
Ag CHIEF MEDICAL OFFICER
MINISTRY OF HEALTH, SOCIAL
WELFARE

CC: RMO
DED
DMO

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 011078 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MEMBRANA POLIMÉRICA, PROCESSO DE FABRICAÇÃO, DISPOSITIVO E USO PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ATRAENTES OU REPELENTES PARA INSETOS

Resumo: A tecnologia proposta apresenta uma membrana polimérica, seu processo de fabricação e um dispositivo para liberação controlada de atraentes ou repelentes para insetos. O dispositivo compreende um liberador de atraentes ou repelentes, formado por borrachas de silicone e uma membrana polimérica contendo substâncias alcalinas que reagem com parte dos reagentes da polimerização que forma o liberador. A interação química entre o liberador e a membrana propicia os seguintes efeitos técnicos: controle da permeabilidade e porosidade da membrana, propiciando a modulação da taxa de liberação de atraentes ou repelentes para o ambiente, além da neutralização do ácido acético gerado na reação de polimerização, mitigando seu efeito de repelência adversa e sem controle. Ademais, a água formada na reação de neutralização se torna um reagente disponível para reação de polimerização do liberador. Quando se utilizam substâncias alcalinas como carbonatos, a neutralização propicia a formação intencional de gás carbônico, o qual é atraente para os insetos.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: ANDERSON MAIA PERES

CPF: 05035469689

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Progresso, 112, apto. 102, Padre Eustáquio

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 30720-404

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 2 de 3

Nome: ÁLVARO EDUARDO EIRAS

CPF: 02460221835

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Brasiléia, 573, apto. 302, Ouro Preto

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31340-090

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 3 de 3

Nome: ELIS PAULA DE ALMEIDA BATISTA

CPF: 79300740210

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Anita Blumberg, nº 09, apto. 301, Bairro Ouro Preto

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31340-150

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	1 - Comprovante de pagamento GRU.pdf
Portaria	2 - Portaria 010-2019 - Prof. Gilberto UFMG.pdf
Relatório Descritivo	3 - Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	4 - Reivindicações.pdf
Desenho	5 - Desenhos.pdf
Resumo	6 - Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.