



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**SUSCEPTIBILIDADE EXPERIMENTAL DO *ANOPHELES*  
(*NYSSORHYNCHUS*) *NUNEZTOVARI* GALBADON, 1940 AO  
*PLASMODIUM VIVAX* GRASSI & FELETTI, 1890 E  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* WELCH, 1897.**

IZIS MÔNICA CARVALHO SUCUPIRA

Belém-Pará  
2006

**IZIS MÔNICA CARVALHO SUCUPIRA**

**SUSCEPTIBILIDADE EXPERIMENTAL DO *ANOPHELES*  
(*NYSSORHYNCHUS*) *NUNEZTOVARI* GALBADON, 1940 AO  
*PLASMODIUM VIVAX* GRASSI & FELETTI, 1890 E  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* WELCH, 1897.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dra. Marinete Marins Póvoa.

Belém-Pará  
2006

Sucupira, Izis Mônica Carvalho

Susceptibilidade Experimental do *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Galbadon, 1940 ao *Plasmodium vivax* Grassi&Feletti e *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, Belém-Pará, 2006, 44p, Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

1. *An. nuneztovari* 2. Susceptibilidade experimental 3. Amazônia brasileira

IZIS MÔNICA CARVALHO SUCUPIRA

**SUSCEPTIBILIDADE EXPERIMENTAL DO *ANOPHELES*  
(*NYSSORHYNCHUS*) *NUNEZTOVARI* GALBADON, 1940 AO  
*PLASMODIUM VIVAX* GRASSI & FELETTI, 1890 E  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* WELCH, 1897.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora:                    Prof.a. Dra. Marinete Marins Póvoa.  
  Seção de Parasitologia, IEC/SVS.

Banca Examinadora:           Prof. Dr. Inocêncio Gorayeb  
  Departamento de Zoologia, MPEG.

  Prof.a. Dra. Roseli La Corte dos Santos  
  Departamento de Parasitologia, UFS.

  Prof.a. Dra. Maria Auxiliadora P. Ferreira  
  Departamento de Histologia, UFPA.

  Prof.a. Dra. Mônica Cristina Moraes da Silva.  
  Seção de Parasitologia, IEC/SVS.

Belém, 07 de Julho de 2006.

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram,  
mas na intensidade com que elas acontecem.*

*Por isso existem momentos inesquecíveis,  
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

*Fernando Pessoa.*

Dedico este trabalho aos meus pais *Walter* e *Nazaré* que com simplicidade e muito amor estiveram integralmente ao meu lado me apoiando e me ensinando o melhor e mais digno modo de trilhar meu próprio caminho.

A minha irmã, *Íris*, que sempre me apoiou em todos os momentos de minha vida.

A minha orientadora,  
Dra. Marinete Póvoa por toda dedicação, paciência, apoio, confiança e exemplo de pesquisadora e pessoa. Saiba que a senhora foi e é muito mais que uma orientadora.

Ao Instituto Evandro Chagas, através da diretoria e serviço de administração que viabilizaram a execução deste trabalho;

Aos técnicos e amigos do laboratório de Entomologia de Malária do Instituto Evandro Chagas, Deocleciano Galiza, Edvaldo Santa Rosa, José Abud, Raimundo Tadeu Lessa e Raimundo Lacerda, e a Ana de Nazaré Martins da Silva por toda ajuda e apoio durante a execução do trabalho;

Ao Prof. Dr. Cláudio Ribeiro e a todos os professores do Seminário Laveran & Deane que discutiram e deram preciosas sugestões para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos Giselle Rachid e Ediclei do Carmo por compartilharem comigo momentos difíceis e alegres, não apenas deste trabalho, mas também de nossas vidas;

À Danielle Barbosa, Ivone Machado, Mônica Moraes, Nathalia Chamma pelo apoio e ajuda nunca negado;

Aos funcionários da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas pelo apoio e respeito desde o início da minha caminhada nesta instituição;

Ao Dr. Álvaro Couto e Dra. Vanja Calvosa e toda sua equipe do Centro de Referência de Doenças Tropicais do Estado do Amapá, ao Dr. Nonato Picanço - IEPA, ao Dr. Allan Galardo e toda sua equipe que tornaram possível a realização deste trabalho no Estado do Amapá;

Aos pacientes que gentilmente aceitaram fazer parte deste nosso projeto;

Aos meus amigos, Ana Cecília Feio, Willian Ricardo Fernandes e Tony Katsuragawa, que mesmo distantes estiveram presentes e me apoiando durante mais esta etapa da minha vida;

Aos meus colegas do curso de mestrado, Victor Riker, Maria Helena Pessoa, Andréa Luciana, Auristela do Carmo, Renato Fernandes, Bruna Tamegão, Clayton e Karolina Kalil que compartilharam comigo momentos inesquecíveis desta caminhada;

Aos meus familiares que sempre acreditaram e apoiaram todos os meus sonhos e idéias.

**SUMÁRIO**

	<b>RESUMO</b> .....	xiii
	<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	MALÁRIA .....	1
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	2
1.3	VETORES.....	5
<b>1.3.1</b>	<b>Biologia dos Vetores</b> .....	8
1.3.1.1	Ovos.....	8
1.3.1.2	Larvas.....	9
1.3.1.3	Pupas.....	10
1.3.1.4	Adultos.....	10
1.4	PARASITO.....	11
<b>1.4.1</b>	<b>Desenvolvimento do Parasito no Hospedeiro Vertebrado – Esquizogonia</b> .....	12
<b>1.4.2</b>	<b>Desenvolvimento do Parasito no Hospedeiro Invertebrado – Esporogonia</b> .....	12
1.5	JUSTIFICATIVA.....	14
1.6	OBJETIVOS.....	15
<b>1.6.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	15
<b>1.6.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	15

<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
2.1	ÁREA DE ESTUDO.....	16
2.2	COLETA DE ANOFELINOS ADULTOS.....	16
2.3	OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F1.....	17
2.4	INFECCÃO DOS ANOFELINOS ADULTOS.....	18
2.5	MONITORAMENTO DA INFECCÃO.....	19
<b>2.5.1</b>	<b>Detecção de Oocisto.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Detecção de Esporozoítos.....</b>	<b>20</b>
2.6	DETERMINAÇÃO DA INFECCÃO PELO TESTE ELISA.....	20
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
3.1	COLETA E OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F1 DOS ANOFELINOS.....	22
3.2	INFECCÃO DOS ANOFELINOS ADULTOS.....	24
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

**RESUMO**

A importância do *An. nuneztovari* como vetor primário de malária já foi comprovado em países da América do Sul como Venezuela, Colômbia e Peru. Na Amazônia brasileira, embora tenha sido encontrado naturalmente infectado com *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* e em alta densidade, é ainda considerado vetor secundário desta doença. O objetivo deste presente trabalho foi avaliar a susceptibilidade do *An. nuneztovari* à infecção por plasmódios humanos. Para isso exemplares da geração F1, obtida em laboratório, de *An. nuneztovari* e *An. darlingi* (espécie controle) foram alimentados, em alimentador artificial, com sangue de pacientes com diagnóstico inicial de malária causada por *P. falciparum*, cuja revisão resultou no diagnóstico de infecção mista. Todas as amostras sanguíneas dos pacientes infectaram espécimes das duas espécies, não mostrando diferença significativa entre elas quanto à susceptibilidade. Para detecção de infecção malárica nos mosquitos foi usado o teste ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay) cujos resultados foram discordantes do diagnóstico laboratorial, já que o teste detectou infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax* VK210 ou *P. vivax* VK247 entre os mosquitos positivos sugerindo que os pacientes apresentavam infecção mista. Também foi observado o curto período de desenvolvimento de oocistos e esporozoítos, de quatro a cinco dias, o que pode ser explicado pela alta temperatura (>30°C) que os mosquitos foram expostos. Assim nossos resultados sugerem possível envolvimento do *An. nuneztovari* na transmissão de malária humana na área estudada e alertam para o papel deste, como possível vetor principal de malária humana na região amazônica brasileira.

**ABSTRACT**

The importance of the *An. nuneztovari* as malaria primary vector had already been confirmed in different South America countries such as Venezuela, Colombia and Peru. In the Brazilian Amazonian, although this specie had been found naturally infected by *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* and in high densities, it is considered a secondary vector of this disease. The aim of this study was to evaluate the susceptibility of the *An. nuneztovari* to the infection by human *Plasmodium* species. For that, mosquitoes specimens of F1 progeny, obtained under laboratory conditions, of the *An. nuneztovari* and *An. darlingi* (control) were fed on an artificial feeding apparatus, using human blood that had been found carrying the malaria parasite, *P. falciparum*, whose revision had resulted as mixed infection. All blood samples from patients had infected specimens of both mosquitoes species tested, and no significant statistical difference was found related to the susceptibility. For the detection malaria infection in mosquitoes specimens it was conducted the ELISA (Enzyme – Linked Imunosorbent Assay) test, whose results were divergent from the diagnostic one, since it has identified mosquitoes specimens infected by *P. falciparum*, *P. vivax* VK210 and/or *P. vivax* VK247, which suggests that the donors patients had mixed infection. It was also observed the short period of development of the oocysts and sporozoites, from four to five days, fact that can be explained by the high temperature (>30<sup>0</sup>C) that the mosquitoes were exposed. Thus, our results suggest the probable enrollment of the *An. nuneztovari* in the human malaria transmission in the study area and point out the role of this mosquito specie as human malaria primary vector in the Brazilian Amazon region.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença sistêmica causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, conhecida também como febre palustre, impaludismo e febre intermitente. É transmitida naturalmente ao homem pela picada de fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, sendo uma das parasitoses que mais afetam o homem.

Em 1717, Giovanni Maria Lancini relacionou os mosquitos dos pântanos com a transmissão de malária (Deane, 1992). Em 1854, Louis Daniel Beauprethuy propôs a hipótese de que tanto a malária quanto a febre amarela eram transmitidas por mosquitos, depois de observar que tais doenças e os mosquitos estavam presentes nas áreas baixas (Laveran, 1905).

O gênero *Plasmodium* foi identificado por Laveran em 1880, quando encontrou grânulos de pigmentação escura em hemácias de pacientes malarígenos (Bruce-Chwatt, 1988). Em 1897, Ronald Ross alimentou mosquitos em pacientes de malária concluindo que existia envolvimento do inseto no ciclo de vida do *Plasmodium* (Hagan&Chauchan, 1997). A descrição do ciclo evolutivo do *P. vivax* e do *P. falciparum*, assim como a confirmação de que os mosquitos anofelinos eram capazes de transmitir malária ao homem foram feitas por Grassi e colaboradores em 1899 (Bruce-Chwatt, 1988).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

A transmissão de malária varia de um lugar para outro, pois sofre influências ecológicas, sócio-culturais e econômicas (Marquez&Gutierrez, 1994).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a malária mata mais de um milhão de pessoas por ano e outras 3,2 bilhões de pessoas estão vivendo em 107 áreas de risco (OMS, 2005) (Figura 01).

Mais de 80% das mortes por malária ocorre na África, onde aproximadamente 66% dessa população está em área de risco (OMS, 2005). No continente africano, a malária causa a morte de mais de um milhão de crianças por ano. Seu clima e a sua ecologia tropical oferecem condições ideais para a proliferação do *An. gambiae* que juntamente com o *P. falciparum*, parasito mais comum da malária nesta região, aumentam a transmissão e o risco de morte desta doença. Outros fatores importantes para alto número de casos desta doença são: a pobreza e a falta de serviços de saúde de qualidade por obstruírem os esforços para o controle e tratamento desta doença (OMS, 2005).

Menos de 15% do total mundial de mortes por malária ocorrem na Ásia, incluindo o leste Europeu, apesar da estimativa de que 49% da população desta região estejam vivendo em área de risco (OMS, 2005).

Nas Américas, 14% da população estão em risco de transmissão, porém esta região representa uma pequena fração do total de mortes registradas no mundo. Desde o ano de 1990, o número de casos de malária relatados na América do Sul, Central e Caribe permanecem baixos, porém há risco de transmissão de malária em nove países que fazem parte da floresta Amazônica e em oito países da América Central e Caribe (OMS, 2005).

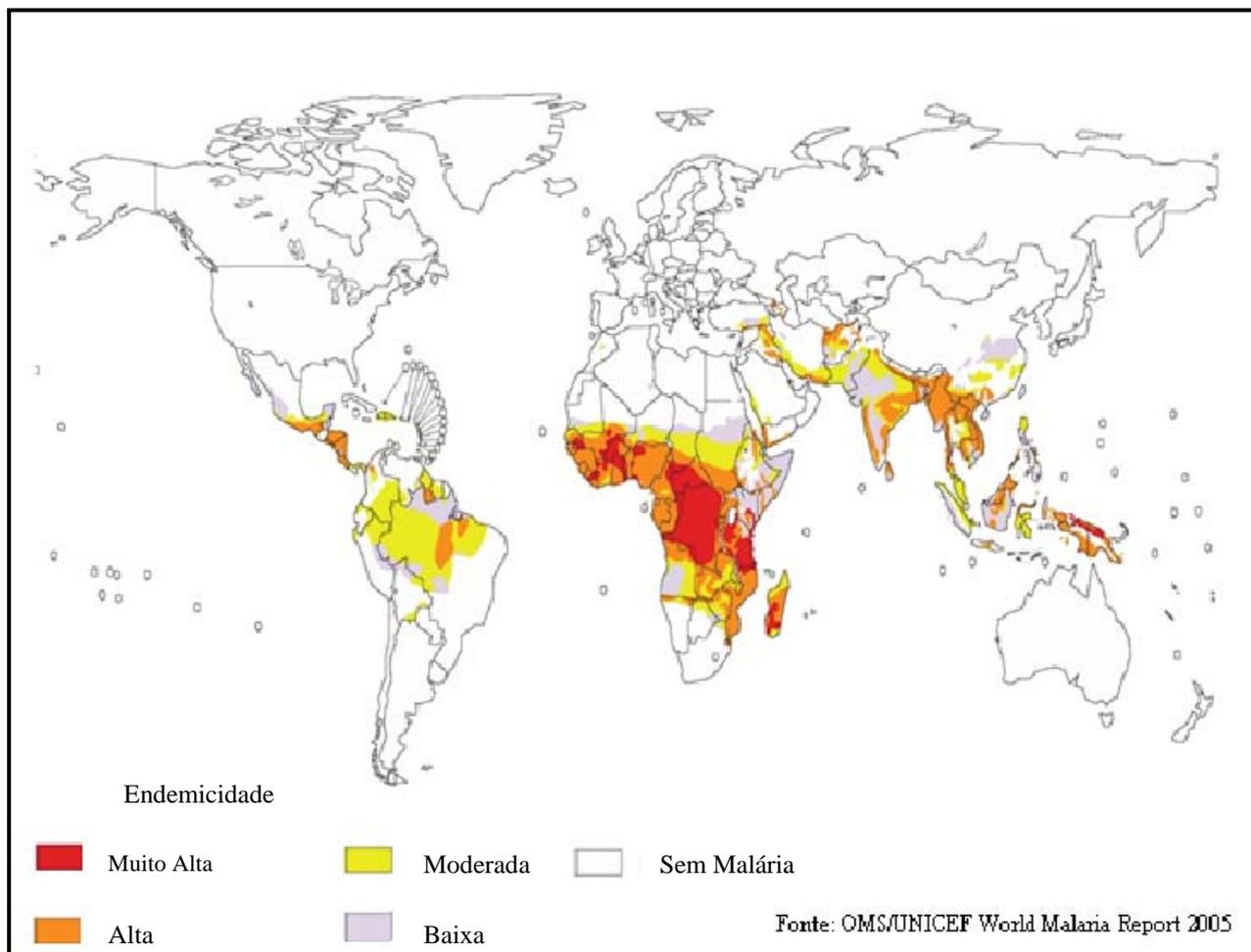


Figura 01 – Mapa atual da distribuição de malária no mundo.

Nas Américas, em 1998, 38% da população habitavam em zonas de condições ecológicas ideais à transmissão de malária o que contribuiu para o aumento no número de casos da doença; o Brasil, neste mesmo ano, notificou o maior número de casos de malária seguido pela região andina. A presença de florestas tropicais, as condições sócio – culturais da população e movimentos migratórios são fatores que contribuem para manutenção da endemia (OPAS, 1999; Martens&Hall, 2000).

A maioria dos casos de malária que ocorre no Brasil está concentrada na Amazônia, uma vez que fatores climáticos como temperatura, umidade, chuvas frequentes e vegetação em torno dos criadouros, favorecem o desenvolvimento dos anofelinos, pois aumentam as atividades vitais, longevidade e ainda fornecem abrigo natural (Motta, 1992).

No ano de 2000 foram registrados mais de 611mil casos da doença no Brasil, sendo 99,4% destes oriundos da Amazônia Legal. No primeiro semestre de 2003 (janeiro–agosto) foi observada uma redução de 13,7% no número de casos de malária quando comparado ao mesmo período de 2002 (SVS/MS/CGPNM, 2004). Em 2005 foram registrados 600.752 casos de malária na região Amazônica sendo 146.188 casos de malária *falciparum*, 446.374 de malária *vivax* e 7.970 de malária mista. No mesmo ano no Estado do Amapá, foram notificados 28.052 casos da doença sendo 22.475 destes autóctones. Também foi observado um aumento no número de casos de malária *falciparum* que passou de 7.263 casos no ano de 2004 para 8.407 em 2005. Além destes, foram registrados 19.123 casos de malária *vivax* e 377 casos de infecção mista. Nos quatro primeiros meses de 2006 foram notificados neste estado 5.208 casos de malária, sendo 1.689 causados por *P. falciparum*, 3.395 por *P. vivax* e 76 diagnosticados como infecção mista (SIVEP–Malária/SVS, 2006).

### 1.3. VETORES

Fatores geológicos, climáticos e ecológicos determinam a distribuição dos vetores da malária no mundo. Tais fatores influenciam diretamente a atividade do vetor (Bustamante, 1957; Tadei, 1998).

Os ecossistemas naturais do mundo têm sido muito alterados pela ação humana. Construção de hidroelétricas, sistemas de irrigação e o desmatamento são exemplos de atividades que proporcionam aumento da população desses insetos e que, conseqüentemente contribuem para o aumento dos casos de malária (Tadei, 1998).

Na Amazônia, fatores climáticos como temperatura em torno de 27°C, umidade relativa acima de 80%, as freqüentes chuvas e a existência de vegetação em torno dos criadouros e habitações favorecem o aumento da fauna anofélica, uma vez que proporcionam aumento das atividades vitais, da longevidade e ainda oferecem abrigo natural aos anofelinos (Motta, 1992).

Os vetores da malária humana pertencem ao reino Animal, filo Arthropoda, classe Insecta, subclasse Pterygota, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Anophelinae, gênero *Anopheles* (Consoli&Oliveira, 1994).

O gênero *Anopheles* está subdividido em quatro subgêneros (Sallum *et al.*, 2000): *Anopheles*, importante vetor na região neotropical; *Cellia*, restrito ao Velho Mundo; *Kerteszia*, que relaciona – se às espécies que se desenvolvem em água acumulada em plantas como as bromeliáceas, sendo algumas de importância no Brasil (*An. cruzii* Dyar & Knab, 1908; *An. bellator* Dyar & Knab, 1906 e *An. homunculus* Kompp,1937), e o subgênero *Nyssorhynchus* que compreende as principais espécies

vetoras do Brasil: *An. darlingi* Root., 1926, *An. aquasalis* Curry, 1932, *An. albitarsis* s.l. Arribalzaga 1878, além de outras espécies encontradas naturalmente infectadas como *An. braziliensis* Chagas, 1907, *An. nuneztovari*, *An. triannulatus* Neiva & Pinto, 1922, *An. strodei* Root, 1926, *An. galvaoi* Causey, Deane & Deane, 1945 entre outros (Deane, 1948, 1986; Klein *et al.*, 1991; Arruda *et al.*, 1998, Póvoa *et al.*, 2000).

*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* é um mosquito encontrado desde o sul do México (Chiapas) até a Nicarágua, na América do Sul é encontrado na Colômbia e leste da Cordilheira dos Andes, Venezuela, Bolívia, Peru, Brasil, Argentina, Paraguai e Guianas (Consoli&Oliveira, 1994; Foratinni, 2002).

Estes anofelinos preferem criadouros que possuam águas límpidas, com certa profundidade, sombreadas, com vegetação flutuante e com pouco teor de sais e matéria orgânica (Consoli&Oliveira, 1994; Foratinni, 2002). É o mais antropofílico e o de comportamento endófilo mais acentuado entre os anofelinos, já que costuma atacar o homem dentro das casas (Deane *et al.*, 1948, 1986; Consoli&Oliveira, 1994). Esta espécie normalmente costuma fazer sua alimentação sangüínea no período crepuscular e noturno podendo alcançar altas horas da noite (Foratinni, 2002).

O *An. darlingi* é a principal espécie vetora de malária humana no Brasil, é bastante susceptível aos plasmódios humanos e possui a capacidade de transmitir a doença mesmo em baixa densidade. É a espécie que melhor se adapta as alterações produzidas no ambiente silvestre, pois a substituição das florestas por pastagens, plantações ou garimpos afasta os mosquitos de hábitos mais silvestres e propicia ambiente favorável ao desenvolvimento deste vetor provocando aumento da sua densidade (Consoli&Oliveira, 1994).

O complexo *albitarsis* é formado por quatro espécies: *An. albitarsis* s. s., *An. deaneorum*, *An. marajoara* e *An. albitarsis* B (Wilkerson, 1995). Recentemente mais uma espécie foi incluída neste complexo, o *An. albitarsis* E encontrado na cidade de Boa Vista – RR (Póvoa *et al.*, 2006). Está distribuído por quase todo continente sul – americano sendo o mais comum e amplamente distribuído anofelino do Brasil (Consoli&Oliveira, 1994).

As espécies deste complexo desenvolvem-se em vários tipos de criadouros, temporários ou permanentes, e naturais ou artificiais. Normalmente é encontrado durante o ano todo, porém é mais abundante na estação chuvosa (Consoli&Oliveira, 1994; Foratinni, 2002). Estes mosquitos podem ser encontrados dentro das casas e apresentar comportamento antropofílico, contudo em muitas regiões como oeste da Amazônia, Centro sul e Sudeste revelam-se predominantemente zoófilos (Deane *et al.*, 1948, Foratinni, 2002).

As espécies deste complexo são consideradas como vetores secundários; no entanto, em algumas localidades são incriminadas como vetores principais de malária (Consoli&Oliveira, 1994; Foratinni, 2002), como ocorre na cidade de Macapá e no município de Serra do Navio, ambos no Estado do Amapá (Segura, 1998; Povoá *et al.*, 2001; Conn, 2002).

*An. nuneztovari* é encontrado no continente sul-americano, em particular na Amazônia (Consoli&Oliveira, 1994). Com base nas análises citogenéticas dos cromossomos politênicos, pode-se admitir a presença de três citotipos denominados A, B e C sendo o citotipo A encontrado nas populações da bacia amazônica, o B e C predominante nas populações da Venezuela e Colômbia, respectivamente (Conn *et al.*, 1993).

Estes anofelinos preferem criadouros de água doce e turva, de pequeno ou médio porte (poças de chuva e impressões no solo), ensolaradas ou levemente sombreadas (Deane, *et al.*, 1948; Forattini, 2002). São zoofílicos e crepusculares, porém atividades antrópicas como as construções de hidroelétricas podem causar o rareamento e até o desaparecimento de animais (fontes alimentares) e provocando também aumento considerável na densidade desta espécie uma vez que a formação das represas fornece excelentes criadouros aos anofelinos e o desmatamento os aproxima das habitações humanas, fatores que alteram seu comportamento, (Tadei *et al.*, 1998).

O *An. (Nys) nuneztovari* é considerado importante vetor de malária em algumas regiões da Amazônia (Consoli&Oliveira, 1994). Segundo Gabaldon, **apud** Forattini (2002, p. 294) o *An. nuneztovari* é considerado como vetor principal de *vivax* e responsável pela manutenção da endemia nas áreas nordeste do continente sul-americana. No entanto, no Brasil mesmo já tendo sido encontrado em densidade elevada e naturalmente infectado, é considerado como vetor secundário (Consoli&Oliveira, 1994).

### **1.3.1. Biologia dos Vetores**

Os anofelinos são holometábolos, isto é, evoluem de ovo até adulto, passando por larva (quatro estádios larvais) e pupa (Forattini, 1996).

#### **1.3.1.1. Ovos**

Os ovos dos anofelinos têm aspecto alongado, simetria bilateral apresentando flutuadores laterais. Esses mosquitos depositam seus ovos na superfície da água, onde permanecem flutuando devido aos flutuadores (Consoli&Oliveira, 1994).

Esses ovos são postos individualmente quando as fêmeas repousam sobre a vegetação ou em detritos na superfície da água ou simplesmente os deixam cair enquanto voam sobre os criadouros. O número de ovos depositado em cada postura varia de 75 a 150 no total. Geralmente, eclodem em dois ou três dias, em temperatura entre 25° e 30° graus centígrados, contudo, podem demorar mais dias dependendo da espécie e da temperatura (Foratinni, 1962, Oliveira-Ferreira *et al.*, 1992, Consoli&Oliveira, 1994). Normalmente não resistem à dessecação, embora alguns resistam à dessecação total por poucas horas ou até vários dias ou a dessecação parcial por semanas em solo úmido (Foratinni, 1962).

#### 1.3.1.2. Larvas

As larvas dos mosquitos anofelinos, sempre aquáticas, apresentam aspecto vermiforme com o corpo nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdome, sendo os dois primeiros tagmas bastante globosos e o abdome semicilíndrico com oito segmentos (Consoli&Oliveira, 1994).

Essas larvas apresentam quatro fases de desenvolvimento ou estádios. Em geral, elas precisam de sete a dez dias para seu desenvolvimento, mas isso pode variar de acordo com a espécie, fatores abióticos (temperatura, luz, salinidade, etc.) e bióticos (vegetais, predadores, etc.) (Consoli&Oliveira, 1994). Elas são facilmente distinguidas dos outros culicíneos pela ausência do sifão respiratório posterior, que é substituído por um aparelho espiracular localizado dorsalmente e que não se projeta visivelmente do corpo (Forattini, 1962) e por sua posição de repouso, paralela à superfície da água (Ricciardi, 1978). Seus habitats são variados, contudo, as espécies da América tropical usam água não contaminada como lagoas, lagos e similares. Os

microhabitats são formados por vegetação flutuante ou emergente como algas e entre detritos flutuantes (Forattini, 1962; Manguin *et al.*, 1996).

#### 1.3.1.3. Pupas

É a fase da metamorfose. As pupas apresentam aspecto de vírgula, são bastante móveis quando perturbadas, mas estão quase sempre paradas na superfície da água (Consoli&Oliveira, 1994).

Essas pupas flutuam na superfície quando estão em repouso, respirando através das trombetas respiratórias, que se projetam para cima, desde o tórax. Diferem das dos demais culicíneos pela presença da cerda nove (espinho rígido na margem lateral posterior que está situado nos segmentos abdominais III a VII) e sua pela forma e tamanho. Nesta fase, que dura de dois a três dias, não se alimentam (Forattini, 1962; Consoli&Oliveira, 1994).

#### 1.3.1.4. Adultos

Os mosquitos adultos machos se diferenciam das fêmeas por seus pêlos mais longos nas antenas. Já as fêmeas podem ser diferenciadas das dos demais gêneros pelos palpos maxilares tão longos quanto à probóscida; enquanto as dos outros gêneros não ultrapassam mais que um quinto do tamanho da probóscida (Forattini, 1962). As fêmeas necessitam de sangue humano ou de outros animais para a maturação e desenvolvimento de seus ovos, e para o aumento de sua longevidade (Consoli&Oliveira, 1994).

Os mosquitos anofelinos apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos: olhos compostos, antenas, palpos e ainda o aparelho bucal tipo picador. No tórax são encontradas as

pernas (2 anteriores, 2 médias e 2 posteriores), duas asas cobertas de escamas claras e escuras e os halteres chamados também balancins que são asas vestigiais. O aparelho digestivo, reprodutor e excretor encontram-se no abdome (Consoli&Oliveira, 1994).

O tempo que decorre de uma alimentação sangüínea a outra é um importante fator para avaliação da capacidade vetora de uma espécie já que determina a freqüência e o contato com o hospedeiro vertebrado (Bregel&Hörler, 1993).

Os mosquitos anofelinos são espécies eurigâmicas cuja cópula depende da formação de enxames para o acasalamento, e esse acasalamento ocorre geralmente durante o vôo (Consoli&Oliveira, 1994).

#### 1.4. PARASITO

O agente etiológico da malária pertence ao filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, Família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* (Lainson, 1992). Há quatro espécies de plasmódios que infectam naturalmente o homem: *Plasmodium malariae* Laveran, 1881; *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium ovale* Stephens, 1922 restrito ao continente africano. O ciclo do plasmódio é do tipo heteroxênico, no qual o homem é o hospedeiro vertebrado onde ocorre reprodução assexuada (esquizogonia) e o mosquito, o invertebrado, responsável pela reprodução sexuada, a esporogonia (Figura 2) (Gilles, 1993).

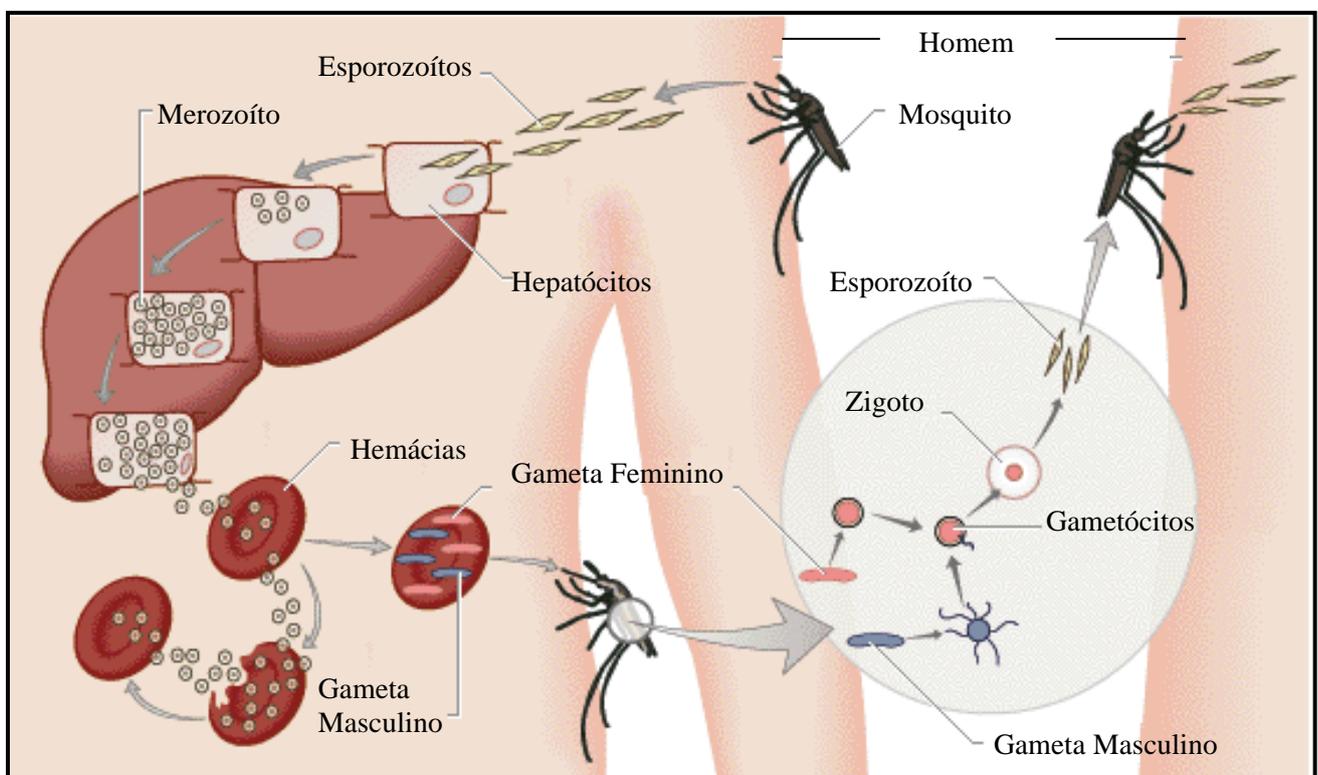
#### **1.4.1. Desenvolvimento do Parasito no Hospedeiro Vertebrado – Esquizogonia**

No hospedeiro vertebrado o ciclo inicia quando a fêmea do mosquito anofelino ao fazer o repasto sangüíneo inocula com a saliva, as formas esporozoíticas do parasito. Os esporozoítos chegam ao fígado, onde invadem os hepatócitos, realizando assim a primeira esquizogonia e iniciando a fase pré-eritrocítica com a produção de inúmeros merozoítos exoeritrocíticos. A ruptura dos hepatócitos libera os merozoítos, que caem na corrente sangüínea e invadem os glóbulos vermelhos iniciando o ciclo eritrocítico. Nas hemácias o parasita passa por uma fase periódica de crescimento e diferenciação chamada esquizogonia, que culmina na produção de esquizontes eritrocíticos que contém entre 10 e 32 merozoítos. A ruptura dos eritrócitos libera os merozoítos na corrente sangüínea e esses poderão invadir novos eritrócitos continuando o ciclo eritrocítico assexuado. No sangue circulante também pode ser encontrada a forma sexuada do plasmódio, os gametócitos, que poderão ser ingeridos pelo anofelino e assim reiniciar o seu ciclo sexuado (Makler&Gibbins, 1991) (Figura 02).

#### **1.3.2 Desenvolvimento do Parasito no Hospedeiro Invertebrado – Esporogonia**

O ciclo esporogônico inicia quando a fêmea do mosquito anofelino, durante o repasto sangüíneo ingere os gametócitos maduros presentes no sangue circulante do hospedeiro vertebrado. No estômago do mosquito ocorre a primeira fase desse ciclo que é a diferenciação dos gametócitos em gametas. Os microgametas são originados pelo processo de exoflagelação. Esses se movimentam rapidamente e no lúmen do estômago fertilizam os macrogametas formando o zigoto. Algumas horas após

a fertilização, o oocineto já formado se fixa na parede do estômago do inseto e penetra no epitélio chegando à superfície externa onde se transforma em oocisto, dando início a segunda fase do desenvolvimento no mosquito. Depois da maturação, o oocisto se rompe liberando os esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito e são inoculados nos hospedeiros juntamente com a saliva durante a picada, iniciando um novo ciclo pré-eritrocítico (Bruce-Chwatt, 1980a; Rey, 1991) (Figura 02).



(Fonte: images. encarta.msn.com/.../ilt/T073615A.gif - 28/11/2005)

Figura 02 – Ciclo de vida do *Plasmodium sp* no hospedeiro vertebrado e invertebrado.

## 1.5. JUSTIFICATIVA

Apesar das diversas campanhas de controle de malária no Brasil, esta doença ainda é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública na Região Amazônica. O *An. marajoara* tem sido considerado o vetor primário em áreas do Estado do Amapá. A importância do *An. nuneztovari* como vetor de malária já foi amplamente demonstrada em países da América do Sul, menos no Brasil. Em localidades do Estado do Amapá e esporadicamente nas do Estado do Pará esta espécie tem sido encontrada em densidade elevada, onde também têm sido registrados casos de malária *falciparum* e *vivax*, o que suscita a questão de sua importância vetorial nestas áreas. Em decorrência dos poucos estudos sobre importância epidemiológica dessa espécie na transmissão de malária na área que ocorre é de fundamental importância verificar o papel do *An. nuneztovari* na transmissão da malária humana em áreas de transmissão no Brasil.

## 1.6. OBJETIVOS

### 1.6.1 Geral:

Determinar a susceptibilidade experimental do *An. nuneztovari* à infecção por *P. vivax* e *P. falciparum*.

### 1.6.2. Específicos:

- ✓ Obter geração F1 de *An. nuneztovari* e *An. darlingi* em laboratório;
- ✓ Infectar espécimes de *An. nuneztovari* e *An. darlingi* com sangue de pacientes portadores de infecção malárica;
- ✓ Determinar a taxa de infecção nas espécies em estudo;
- ✓ Verificar a susceptibilidade do *An. nuneztovari* à *P. vivax* e *P. falciparum* e comparar com a espécie controle (*An. darlingi*).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. ÁREA DE ESTUDO:**

O estudo foi realizado na comunidade ribeirinha de São Sebastião, localizada no Estado do Amapá, distante aproximadamente 30 minutos da cidade de Macapá. Esta comunidade, pertencente ao município de Santana, está situada às margens do Rio Matapi em uma área de várzea que sofre influência da maré.

Segundo a classificação de Köppen, o clima é equatorial super úmido sendo caracterizado por temperaturas anuais que variam entre 25 e 32 °C com elevados índices de pluviosidade, em média 2.500 mm/ano. Durante o inverno – de dezembro a agosto – as chuvas são frequentes; no verão ocorrem as secas, perdurando nos meses de setembro, outubro e novembro (SECTAM, 2000).

Em São Sebastião encontram-se moradias de pequeno porte compostas em sua maioria de casas isoladas e as crianças compõem a classe etária predominante. As principais atividades econômicas desta região são: pesca, extração de produtos da floresta, agricultura de subsistência e pecuária de búfalos. O índice de migração é baixo e a mudança de paisagem pequena.

### **2.2. COLETA DE ANOFELINOS ADULTOS:**

Foram realizadas coleta das formas adultas de três horas (18:00 às 21:00 horas) em diferentes pontos na área de estudo sendo utilizada captura de atração utilizando capturadores de sucção. A umidade relativa do ar e a temperatura ambiente foram registradas em fichas padronizadas, de hora em hora, assim como as variações do vento, fases da lua e ocorrência de chuva.

Os espécimes coletados foram acondicionados em copos apropriados e devidamente identificados com data, local, hora e tipo de captura (intra ou peridomicílio) e em seguida, acondicionados em uma caixa de isopor e alimentados em algodão embebido em água natural.

Todos os exemplares capturados foram identificados segundo a chave dicotômica de Gorham *et al*, 1967 modificada. Os exemplares vivos foram anestesiados com acetato de etila (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>).

### 2.3. OBTENÇÃO DE GERAÇÃO F1

A metodologia abaixo está descrita segundo Silva *et al* (2006).

Os espécimes de *An. nuneztovari* e *An. darlingi* coletados em campo, já ingurgitados, foram colocados em gaiolas de 22 X 22 centímetros e mantidos com alimentação à base de dextrose por 2 – 3 dias, entre 28°C e 33°C e umidade relativa entre 70 a 90%. A oviposição seguiu o método descrito por Klein *et al*. 1990, na qual no terceiro dia após o repasto sanguíneo, as fêmeas foram anestesiadas com acetato de etila para remoção de uma das asas e então depositadas individualmente em copos plásticos de 5 X 3,5cm com 0,5cm de água.

Os ovos, separados em grupos de 200–300 foram depositados em bacias brancas redondas com 23,5cm de diâmetro contendo água mineral até a altura de aproximadamente 2,5cm. Após a eclosão as larvas foram alimentadas com ração para peixe (TetraMin–Tropical TetraSales–USA). No quarto dia após a eclosão, as larvas foram transferidas para outras bacias contendo água mineral e alimentadas 2–3 vezes por dia até a fase de pupa.

As pupas foram transferidas diariamente para copos descartáveis com água até cerca de 2 cm de altura, os quais foram colocados nas gaiolas para emersão dos adultos. Estes receberam alimentação a base de dextrose durante 3 a 4 dias. Depois deste período as fêmeas foram deixadas sem alimentação por três horas, após o que foram alimentadas em animais de laboratório (camundongos ou codornas), e após o repasto, as mesmas receberam alimentação à base de dextrose 10% até a postura e início de um novo ciclo.

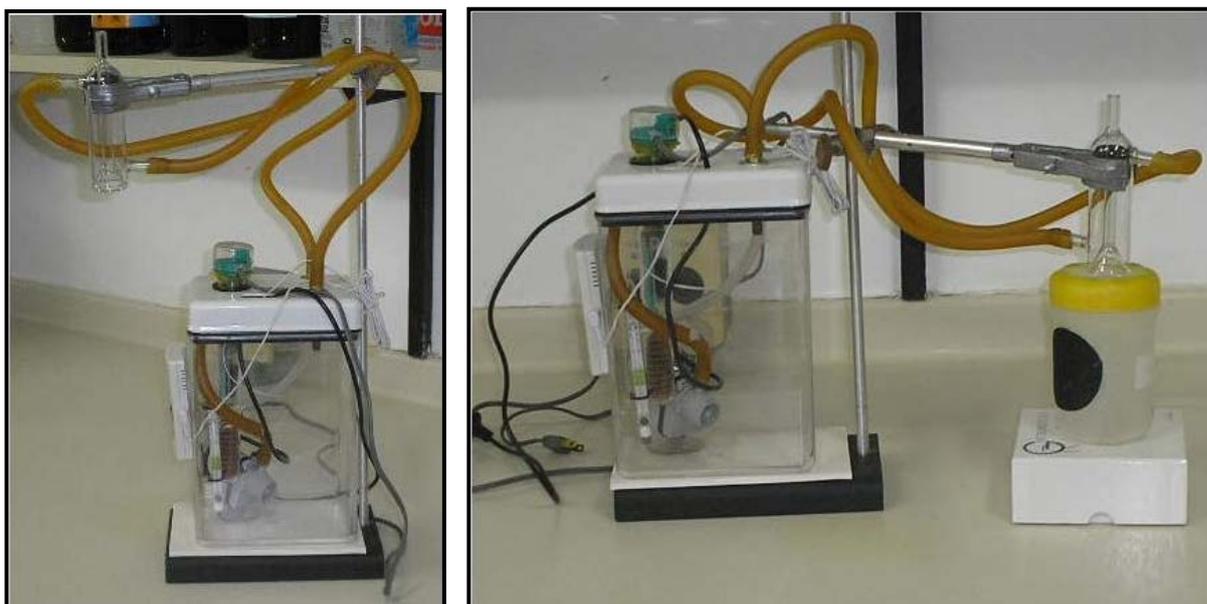
#### 2.4. INFECÇÃO DOS ANOFELINOS ADULTOS.

A geração F1, obtida em laboratório a partir das espécies coletadas no campo, foi utilizada na infecção experimental. Para a infecção dos espécimes de *An. nuneztovari* e *An. darlingi* utilizamos sangue de pacientes portadores de infecção malárica não grave e maiores de 21 anos. Não foi considerado critério de exclusão o fato de não se detectar as formas sexuadas no sangue destes pacientes.

O sangue foi obtido por punção venosa utilizando material estéril, descartável e individual, após conhecimento do estudo (objetivos, importância, etc) e anuência, por escrito (termo de consentimento) dos participantes do mesmo. De cada paciente foram coletados 10mL de sangue, armazenados em tubos Vacutainer® contendo heparina.

A alimentação foi feita em alimentador artificial, desenvolvido e adaptado pelos técnicos da equipe de entomologia de malária do Instituto Evandro Chagas Deocleciano Galiza Primo, Raimundo Nonato da Luz Lacerda e Raimundo Tadeu Lessa de Souza, (Figura 03), onde utilizamos uma membrana (Parafilm) e a temperatura foi mantida em torno de 37°C. Para cada repasto sangüíneo foram

colocados 40 mosquitos/copo telado por aproximadamente 30 minutos. Após o repasto as fêmeas alimentadas (abdome visivelmente dilatado) foram mantidas no laboratório em condições padronizadas e alimentadas com solução à base de dextrose (Klein *et al.*, 1991).



Fonte: Acervo IEC/SVS/MS

Figura 03 – Alimentador artificial utilizado para infecção experimental dos anofelinos.

## 2.5. MONITORAMENTO DA INFECÇÃO

### 2.5.1. Detecção de Oocisto

No décimo dia após o repasto infectante, 50% dos mosquitos sobreviventes de cada copo tiveram seus intestinos retirados e posteriormente colocados em lâminas contendo uma gota de solução de mercúrio a 10%, sendo então cobertos com lamínula e examinados em microscópio de luz (400x) para detecção e contagem de oocistos (WHO, 1975).

### 2.5.2. Detecção de Esporozoítos

Para detectar os esporozoítos foram utilizados 50% dos mosquitos sobreviventes à alimentação sanguíneas. Para esta detecção, foi realizada dissecação das glândulas salivares quinze dias após a infecção. As glândulas foram colocadas entre lâminas e lamínula com uma gota de PBS e examinadas em microscópio de luz (400x).

### 2.6. DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO PELO TESTE ELISA

Todos anofelinos alimentados foram utilizados para detecção da infecção malárica pelo método ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay) descrito por Wirtz *et al.* (1987).

Para o preparo do antígeno, foram usados as cabeças/tóraxes e abdomens dos exemplares que foram colocados em tubos eppendorf de 1,5 ml contendo 50µl de tampão bloqueador (BB) com Nonidet – NP – 40 e triturados. Em seguida foram acrescentados 200µl de tampão BB.

As microplacas (Nunc – Imuno plate MaxiSorp) foram sensibilizadas com 50µl de MoAbs específicos (Tabela 1) e incubados à temperatura ambiente (TA) por cerca de 12 horas. Após esta incubação todo conteúdo dos poços foi aspirado e esses receberam 50µl de tampão BB seguindo-se uma nova incubação à TA por uma hora. Após esse tempo, foi feita a aspiração do conteúdo dos poços e se adicionou 50µl do antígeno, controles positivos e controles negativos nos poços específicos. Uma nova incubação de duas horas foi realizada à TA. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS–Tween –20 a 0,05% e então 50µl/poço dos conjugados específicos (MoAbs específicos marcados com peroxidase) foram adicionados, seguida de outra incubação de uma hora à TA. Três novas lavagens com 200µl de PBS – Tween foram

realizadas e finalmente 200µl de solução tampão do substrato (ABTS + Peróxido de hidrogênio) foram adicionados em cada poço e incubado durante 30 a 60 minutos à TA.

A leitura dos resultados foi realizada visualmente e a 405nm em leitor de ELISA (Titertex Multikan Plus – MK II).

Os controles negativos foram usados mosquitos machos e os positivos obtidos de fabricantes (Kiekegaard&Perry Laboratories). O ponto de corte foi duas vezes a média dos controles negativos.

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no Programa de Estatística BioEstat 4.0 (Ayres, 2005). Para as análises, usamos o teste binomial: duas proporções e o nível de significância adotado foi 5%.

Tabela 1: Material utilizado no teste ELISA

MATERIAL	<i>P. vivax</i> VK 210	<i>P. vivax</i> VK 2407	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>
Anticorpos de captura	VK210 – NSV3	VK210–247– 1G12	PF – 2 a 10 – 725 – 49	Pm – 93 – 10
Conjugado	VK210NSV3*	VK210–247– G12*	Pf*	Pm – 93 – 10*
Controle positivo	VK210 – 210	VK247	Pf	Pm

\* Marcados com peroxidase.

Pf: *Plasmodium falciparum*

Pm: *Plasmodium malariae*

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. COLETA E OBTENÇÃO DE GERAÇÃO F1 DE ANOFELINOS

Foram realizadas duas coletas de anofelinos adultos, em julho de 2005, na localidade de Santo Antônio, município de Santana, Estado do Amapá no período das 18:00h às 21:00h O número de mosquitos e as espécies coletadas estão descritas na Tabela 2.

Os mosquitos coletados foram mantidos em laboratório com alimentação à base de solução de dextrose a 10% por três dias, quando suas asas foram removidas e colocados em copos plásticos pequenos com água para oviposição (Figura 4A). O tempo médio de eclosão dos ovos foi de 1 – 2 dias. As larvas se desenvolveram em água mineral (Figura 4B) e a mortalidade observada foi: 0,28 % *An. nuneztovari* e 0,31% *An. darlingi*.

A geração F1 obtida [5937 *An. nuneztovari*, e 4225 *An. darlingi*] foi mantida no laboratório de Entomologia do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), com temperatura variando entre 29 e 34°C e umidade relativa entre 98 e 99%.

Tabela 2: Número de mosquitos anofelinos coletados, *An. darlingi* e *An. nuneztovari* em São Sebastião – Santana – Amapá em Julho / 2005 e o número de exemplares obtidos na Geração F1

Espécies	Julho / 2005			F <sub>1</sub>
	1ª Coleta	2ª Coleta	Total (%)	
<i>An. nuneztovari</i>	358	189	547	5933
<i>An. darlingi</i>	269	293	562	4225
Outros	194	394	588	-
TOTAL	821	876	1697	10158



Figura 4: Bandejas com copos contendo fêmeas fazendo postura forçada (A) e estantes contendo bandejas com larvas (B) das duas espécies de anofelinos no Laboratório de Entomologia do IEPA.

### 3.2. INFECÇÃO DOS ANOFELINOS ADULTOS.

Aceitaram participar deste estudo cinco pacientes portadores de infecção malárica, duas mulheres e três homens, atendidos no Centro de Referência em Doenças Tropicais do Amapá. O perfil destes pacientes está mostrado na Tabela 3. O diagnóstico laboratorial inicial foi dado como infecção causada somente por *P. falciparum*, o que não foi confirmado na revisão no Instituto Evandro Chagas, pois foi verificada também a presença de *P. vivax*, caracterizando-as como infecção mista.

Da geração F1 obtida, 924 fêmeas de anofelinos (412 *An. nuneztovari* e o 512 *An. darlingi* foram alimentadas com sangue destes pacientes dos quais 387 (41,88%) espécimes foram positivos pelo teste ELISA Somente cinco exemplares foram dissecados, 1 *An. nuneztovari* e 4 *An. darlingi*, entre o sétimo e o nono dia após o repasto infectante, onde observamos um espécime de *An. nuneztovari* com esporozoítos nas glândulas salivares e um espécime de *An. darlingi* com três oocistos no estômago.

Dos 412 exemplares de *An. nuneztovari* alimentados, 49,03% (202/412) estavam positivos pelo teste ELISA, deste grupo 11,4% (23/202) positivos para PF, 54% (109/202) para VK210, 26,2% (53/202) para VK247 e 8,4% (17/202) para mista (PF + VK210 ou PF+ VK247). Com relação aos 512 mosquitos *An. darlingi* alimentados, obtivemos 36,13% (185/512) positivos pelo teste ELISA, 21,1% (39/185) para PF, 29,1% (54/185) para VK210, 42,2% (78/185) para VK247 e 7,6% (14/185) para mista (PF+VK210 ou PF+VK247) (Tabela 4). O *An. darlingi* foi significativamente mais susceptível ao *P. falciparum* que o *An. nuneztovari* (p= 0,0047) e o *An. nuneztovari* foi significativamente mais susceptível ao *P. vivax* que o *An. darlingi* (p= 0,0209).

Observamos que dos 387 anofelinos positivos, 36,17% (140/387) apresentaram apenas tórax positivo, sendo 35,64% (72/202) *An. nuneztovari* e 36,75% (68/185) *An. darlingi*; 36,43% (141/387) apenas abdômen positivo sendo 33,66% (68/202) *An. nuneztovari* e 39,45% (73/185) *An. darlingi*, e 27,4% (106/387) apresentaram ambos, tórax e abdômen positivos, dos quais 30,7% (62/202) de *An. nuneztovari* e 23,78% (44/185) de *An. darlingi* (Tabela 5, Figura 5).

Tabela 3: Perfil dos pacientes doadores de sangue infectado por parasitas de malária para produção de infecção em exemplares dos mosquitos estudados.

Paciente	Parasitemia	Origem da infecção	Malária Progressiva	Início dos Sintomas	Data da infecção nos anofelinos
MOM (I)	3000/mm <sup>3</sup>	Cupuxi	1ª malária	25/07/2005	28/07/2005
AGS (II)	50/mm <sup>3</sup>	Mazagão	NI	24/07/2005	27/07/2005
MASS (III)	40/mm <sup>3</sup>	Mazagão	NI	23/07/2005	27/07/2005
GSP (IV)	250/mm <sup>3</sup>	Guiana Francesa	Mais de quatro	17/07/2005	28/07/2005
JSS (V)	350/mm <sup>3</sup>	Mazagão	Três vezes	26/07/2005	29/07/2005

NI – Não informado

Tabela 4: Número de anofelinos alimentos e total de exemplares positivos por espécie de plasmódios pelo teste ELISA.

Espécies	Nº de exemplares alimentados	Nº de exemplares positivos pelo teste ELISA				Total Positivo
		PF	VK210	VK247	Mista	
<i>An. nuneztovari</i>	412	23 (11,4%)	109 (54%)	53 (26,2%)	17 (8,4%)	202 (49,03%)
<i>An. darlingi</i>	512	39 (21,1%)	54 (29,1%)	78 (42,2%)	14 (7,6%)	185 (36,13%)
Total	924	62	163	131	31	387

PF: *Plasmodium falciparum*

VK210/VK247: variantes do *Plasmodium vivax*

Mista: PF+VK210 + PF/VK247

Tabela 5: Resultado do teste ELISA para detecção da CSP de *P. falciparum*, *P. vivax* VK 210 e VK 247 no tórax e abdômen dos mosquitos infectados experimentalmente.

Espécies	Tórax + Abdome -	Tórax - Abdome +	Tórax + Abdome +	Total
<i>An. nuneztovari</i>	35,64% (72/202)	33,66% (68/202)	30,7% (62/202)	52,2% (202/387)
<i>An. darlingi</i>	36,75% (68/185)	39,45% (73/185)	23,78% (44/185)	47,8% (185/387)
Total	36,17% (140/387)	36,43% (141/387)	27,4% (106/387)	100% (387/387)

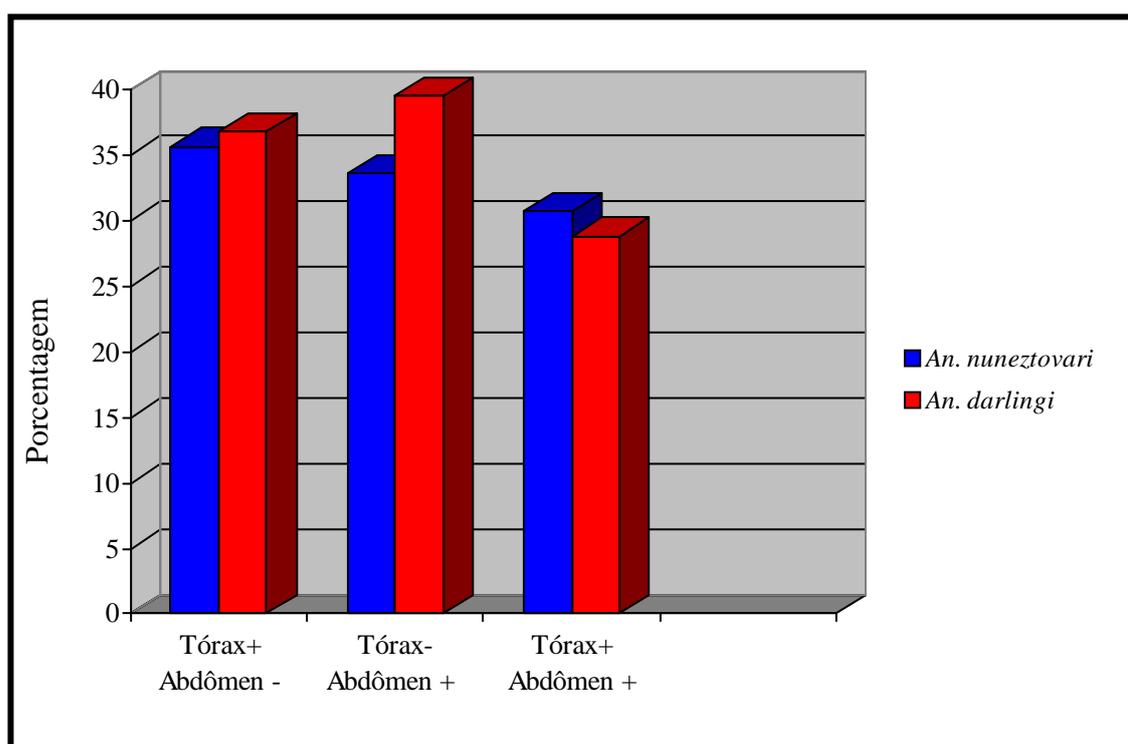


Figura 6: Número de exemplares positivos para infecção por *Plasmodium* por espécie e parte do corpo, tórax e abdome.

Com sangue do paciente I, 83 *An. darlingi* fizeram repasto sanguíneo, dos quais 44,57% (37/83) foram positivos: 8,1% (3/37) para PF, 21,6% (8/37) para VK210, 64,9% (24/37) para VK247 e 5,40% (2/37) para mista (PF+VK210/ PF+VK247). Com sangue do paciente II, 109 mosquitos [89,9% (98/109) *An. darlingi* e 10,1% (11/109) *An.nuneztovari*] fizeram repasto e destes 59 (54,13%) se infectaram sendo 54,5% (6/11) *An. nuneztovari* com VK210 e 54,08% (53/98) *An.darlingi* sendo 18,9% (10/53) com PF, 43,39% (23/53) com VK210, 28,3% (15/53) com VK247 e 9,4% (5/53) para infecção mista (PF+VK210 + PF/VK247) (Tabela 6).

Um total de 188 mosquitos anofelinos [47,3% (89/188) *An. darlingi* e 52,7% (99/188) *An. nuneztovari*] fizeram repasto com sangue do paciente III, destes 43,4% (43/99) *An. nuneztovari* mostraram resultados positivos no teste ELISA sendo 25,6% (11/43) para PF, 44,2% (19/43) para VK210, 20,9% (9/43) para VK247 e 9,3% (4/43) para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247). Neste mesmo paciente obtivemos um total de 34,83% (31/89) *An. darlingi* positivos sendo 22,6% (7/31) para PF, 32,2% (10/31) para VK210, 42% (13/31) para VK247 e 3,2% (1/31) para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247) (Tabela 6).

Realizaram repasto sanguíneo 190 mosquitos anofelinos, 53,2% (101/190) *An. nuneztovari* e 46,8% (89/190) *An. darlingi* com sangue do paciente IV e observamos 43,6% (44/101) *An. nuneztovari* positivos, 9,1% (4/44) para PF, 45,45% (20/44) para VK210, 38,63% (17/44) para VK247 e 6,82% (3/44) para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247). Observamos também 24,72% (22/89) *An. darlingi* positivos, sendo 45,4% (10/22) para PF, 13,6% (3/22) para VK210, 32,0% (7/22) para VK247 e 9,0% (2/22) para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247) (Tabela 6).

Com sangue do paciente V foram alimentados 190 mosquitos anofelinos [53,2% (101/190) *An. nuneztovari* e 46,8% (89/190) *An. darlingi*], destes 64,35% (65/101) *An. nuneztovari* positivos, 6,1% (4/65) para PF, 63,1% (41/65) para VK210, 17,0% (11/65) para VK247 e 13,8% (9/65) para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247). Obtivemos 29,21% (26/89) *An. darlingi* positivos, 26,9% (7/26) para PF, 15,4% (4/26) para VK210, 42,3% (11/26) para VK247 e 15,4% (4/26) para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247) (Tabela 6).

Foi realizada uma réplica com o sangue do paciente V e 164 anofelinos [61% (100/164) *An. nuneztovari* e 39,0% (64/164) *An. darlingi*] foram alimentados. Obtivemos 44% (44/100) *An. nuneztovari* positivos, 9,10% (4/44) para PF, 52,27% (23/44) para VK210, 36,36% (16/44) para VK247 e 2,27% (1/44) para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247); e 25% (16/64) *An. darlingi* positivos, 12,5% (2/16) para PF, 37,5% (6/16) para VK210, 50% (8/16) para VK247 e nenhum mosquito mostrou-se positivo para infecção mista (PF+VK210/PF+VK247) (Tabela 6).

O total de espécimes de mosquitos infectados por espécie de *Plasmodium* e parte do corpo testada está expresso na Tabela 7 e Figura 6. A taxa de infecção obtida foi 49,03% para *An. nuneztovari* e 36,13% para *An. darlingi* mostrando diferença significativa entre essas espécies ( $p = 0,0001$ ).

Tabela 6: Resultado do teste de ELISA por espécie mosquito estudada e de *Plasmodium* testada por paciente.

Paciente	Espécie	Mosquitos Testados	Mosquitos Positivos	Data da Infecção	Morte dos mosquitos	Resultado do ELISA			
						PF	VK210	VK247	PF+VK210/ PF+ VK247
1	<i>An (Nys) nuneztovari</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>An. (Nys) darlingi</i>	83	37 (44,57%)	28/07/2005	01/08/2005	3	8	24	
2	<i>An (Nys) nuneztovari</i>	11	6 (54,5%)	27/07/2005	01/08/2005	-	6	-	-
	<i>An. (Nys) darlingi</i>	98	53 (54,08%)	27/07/2005	01/08/2005	10	23	15	5
3	<i>An (Nys) nuneztovari</i>	99	43 (43,4%)	27/07/2005	01/08/2005	11	19	9	4
	<i>An. (Nys) darlingi</i>	89	31(34,83%)	27/27/2005	01/08/2005	7	10	13	1
4	<i>An (Nys) nuneztovari</i>	101	44 (43,6%)	28/07/2005	02/08/2005	4	20	17	3
	<i>An. (Nys) darlingi</i>	89	22 (24,72%)	29/07/2005	02/08/2005	10	3	7	2
5	<i>An (Nys) nuneztovari</i>	101	65 (64,35%)	29/07/2005	02/08/2005	4	41	11	9
	<i>An. (Nys) darlingi</i>	89	26 (29,21%)	29/07/2005	02/08/2005	7	4	11	4
5 (réplica)	<i>An (Nys) nuneztovari</i>	100	44 (44,0%)	29/07/2005	02/08/2005	4	23	16	1
	<i>An. (Nys) darlingi</i>	64	16 (25%)	29/07/2005	02/08/2005	2	6	8	-

PF: *Plasmodium falciparum*

VK210/VK247: variantes do *Plasmodium vivax*

Mista: PF+VK210 + PF/VK247

Tabela 7: Total de espécimes de mosquitos infectados por espécie de *Plasmodium* e parte do corpo testada.

Espécies	Total de espécimes infectados	TÓRAX					ABDOME				
		PF	VK210	VK247	PF+VK210/ PF+ VK247	Total	PF	VK210	VK247	PF+VK210/ PF+ VK247	Total
<i>An. nuneztovari</i>	202	12	70	41	13	136	15	52	39	13	119
<i>An. darlingi</i>	185	21	38	53	06	118	27	34	61	04	126
Total	387	33	108	94	19	254	42	86	100	17	245

PF: *Plasmodium falciparum*

VK210/VK247: variantes do *Plasmodium vivax*

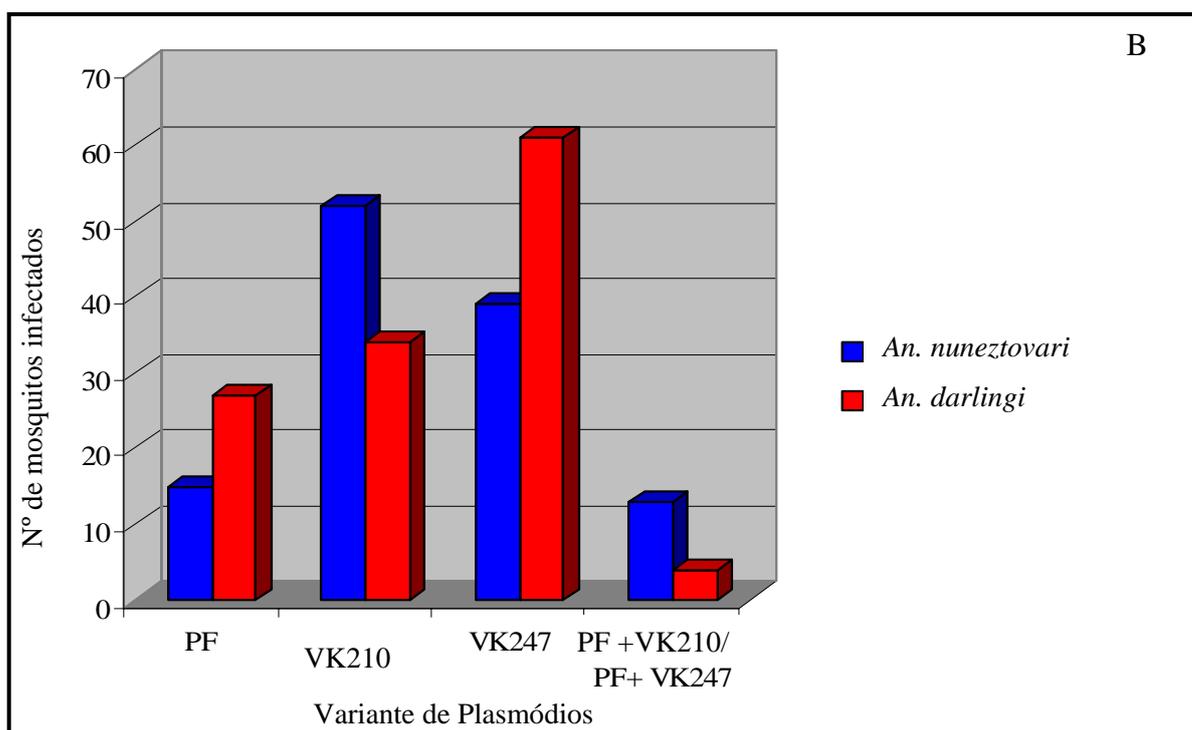
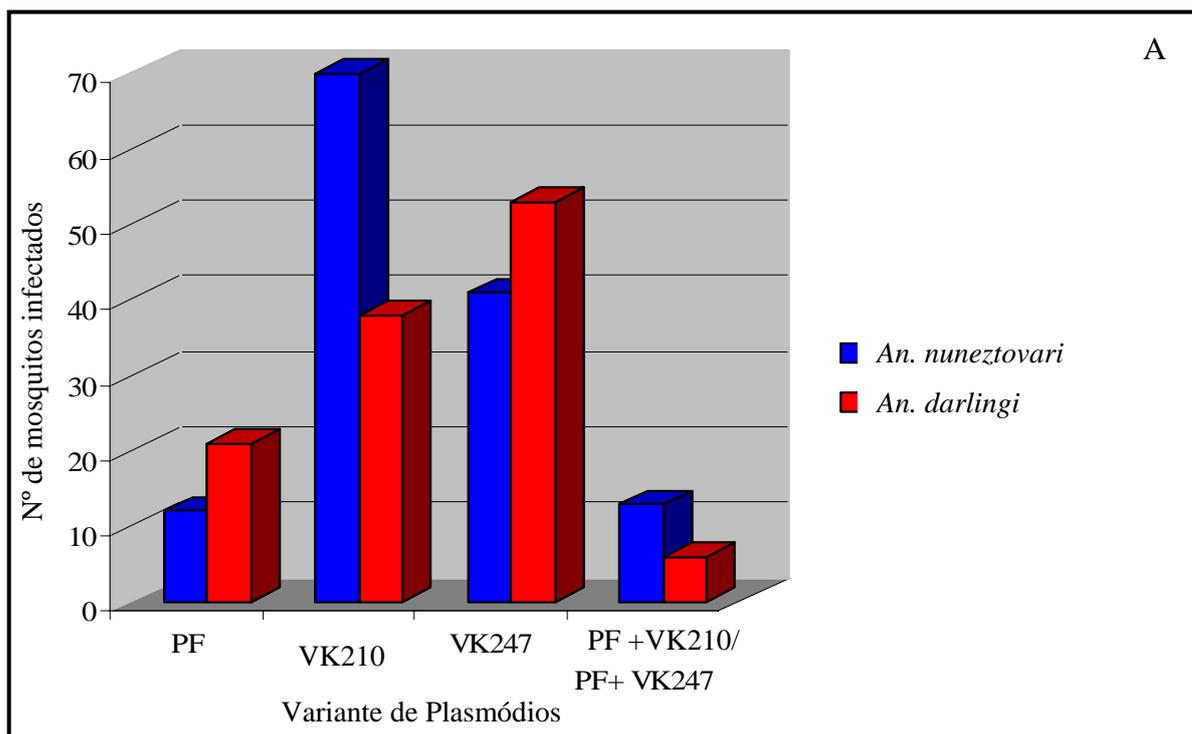


Figura 7: Total de mosquitos infectados por espécie de *Plasmodium* e parte do corpo testada A) tórax e B) Abdômen

#### 4. DISCUSSÃO

A temperatura e a umidade são fatores de grande importância para manutenção de gerações de mosquitos em laboratório. A temperatura poderá influenciar na duração do ciclo gonotrófico, no período de desenvolvimento dos ovos (Rua, 2005), no desenvolvimento larvário e nas formas adultas resultantes (Forattini, 2002). A faixa de temperatura e o período favorável ao desenvolvimento larvário, segundo Forattini (2002) estão entre 20 e 30°C e de 8 a 10 dias respectivamente. Em nosso experimento a variação de temperatura observada foi maior, de 29 a 34°C e o desenvolvimento larvário não foi prejudicado, variando entre 7 e 8 dias.

Estudo de colonização com outras espécies de anofelinos no Brasil, como o de Klein *et al* (1990), mostrou taxa de mortalidade de 10%. A taxa de mortalidade larvária observada no presente estudo, assim como a observada no experimento de Silva *et al* (2006) foi baixa, 0,28 % em *An. nuneztovari* e de 0,31 % em *An. darlingi*. Outros fatores importantes para a baixa mortalidade das larvas foram a pouca ou nenhuma manipulação das bacias com larvas e a utilização de água mineral nas mesmas.

No presente trabalho, observamos que não houve concordância entre o diagnóstico laboratorial de origem e a revisão feita em nosso laboratório, fato comprovado pelo teste de ELISA realizado nos mosquitos, pois o primeiro mostrou que os pacientes apresentavam somente infecção por *P. falciparum*, enquanto que tanto na revisão do diagnóstico quanto no teste ELISA dos anofelinos alimentados com sangue destes pacientes, observamos também formas sanguíneas do *P. vivax*, caracterizando assim, a infecção como mista em todos os mosquitos. Este achado comprova a divergência de diagnóstico laboratorial.

Neste estudo, em todos os repastos sanguíneos realizados, obtivemos anofelinos positivos para os plasmódios humanos PF, VK210 e VK247, com taxa de infecção total de 41,88 %, apesar destes pacientes apresentarem baixas parasitemias (40 a 3000 parasitos/mm<sup>3</sup> de sangue). É importante ressaltar que, assim como nos estudos experimentais conduzidos por Klein *et al*, 1991 e Silva, 2001, a infecção dos anofelinos foi produzida mesmo sem a detecção de formas sexuadas (gametócitos) nas lâminas dos pacientes no momento do diagnóstico laboratorial. Este é um achado importante, uma vez que em outros estudos de infecção experimental com diferentes espécies de anofelinos foi demonstrado que para infectar mosquitos é necessário a presença de gametócitos no sangue do doador, e em densidade que pode variar de 10 a mais de 50 gametócitos/ $\mu$ L de sangue (Gouagna *et al*, 1998; Lee *et al*, 2001; Collins and Jeffery, 2003). Nossos resultados sugerem que a não detecção das formas sexuadas no diagnóstico laboratorial, não significa ausência total destas formas no sangue periférico dos pacientes.

Estudos anteriores incriminam o *An. darlingi* como o principal vetor de malária da região amazônica por ser encontrado naturalmente infectado e ser, experimentalmente, o mais susceptível aos plasmódios humanos (Deane *et al*, 1986; Klein *et al*, 1991; Consoli&Oliveira, 1994; Tadei *et al.*, 1998; 2000; Santos *et al*; 2005). Nosso estudo mostrou diferença significativa entre as espécies de anofelinos estudadas, mostrando que o *An. nuneztovari* foi mais susceptível à infecção aos plasmódios que o *An. darlingi*, isto é, número total de mosquitos encontrados positivos, quer fosse em diferentes partes do corpo ou em ambas, tórax/cabeça ou abdômen.

Segundo Klein *et al*, (1991) a detecção do antígeno CS, pelo teste ELISA, na região cabeça/tórax mostra que o anofelino é susceptível a infecção pelo

*Plasmodium sp*, mas não prova que há esporozoítos nas glândulas salivares e que possa haver transmissão de malária, pois estes podem estar presentes na hemocele. Quando analisamos os mosquitos possivelmente infectantes do presente trabalho, ou seja, aqueles que apresentaram positividade para esporozoítos, observamos que não há diferença significativa entre essa duas espécies estudadas embora o *An. nuneztovari* tenha apresentado maior número de espécimes infectados.

Neste estudo, também foi possível notar o curto período de desenvolvimento dos plasmódios nestes vetores. Num período de quatro a cinco dias após o repasto sangüíneo, detectamos exemplares tanto com abdome quanto com cabeça/tórax positivos pelo teste ELISA. Estes resultados são diferentes dos encontrados em outros estudos de infecção experimental que mostraram períodos para detecção de oocistos variando entre sete e onze dias e de esporozoítos entre 14 e 21 dias (Klein *et al*, 1991; Gougna *et al*, 1998; Lal *et al*, 2001; Lee *et al*; 2001). É possível que a alta temperatura, acima de 30°C, observada no insetário, onde os anofelinos permaneceram após o repasto sangüíneo, tenha provocado o rápido desenvolvimento dos oocistos e esporozoítos nos mosquitos estudados.

Muitos estudos têm sugerido que a mortalidade observada nos anofelinos após um repasto infectante seria conseqüência da presença dos plasmódios. Estes protozoários provocariam danos aos tecidos do estômago e das glândulas salivares dos vetores ao atravessarem as mesmas, alterações fisiológicas como diminuição nos níveis de aminopeptidase e o esgotamento das reservas dos mosquitos como a baixa concentração de aminoácidos (Ferguson&Read, 2002). A formação da resposta imune, que leva a um grande gasto de energia e que desvia recursos usados para o

desenvolvimento dos vetores, e a alteração comportamental dos anofelinos infectados também são fatores que provocam a mortalidade dos mesmos (Ferguson&Read, 2002).

Não nos foi possível realizar a dissecação de estômagos e glândulas salivares de número significativo de mosquitos devido à alta mortalidade observada poucos dias após o repasto sanguíneo (quatro a cinco dias). No entanto, neste caso, não atribuímos essa mortalidade à infecção nos vetores. Acreditamos que problemas na padronização das condições necessárias para o desenvolvimento da colônia em nosso insetário e a influência de aerossóis de produtos químicos tóxicos provenientes de outros laboratórios, foram os principais fatores responsáveis por tal mortalidade.

O *An. nuneztovari* tem mostrado alta capacidade de reprodução em ambientes alterados, como por exemplo, construções de hidroelétricas, (Tadei *et al.*, 1998; 2000), preferência pelo sangue humano (Rubio-Palis *et al.*, 1994; Comunicação Pessoal – Auristela Carmo) e tem sido encontrado naturalmente infectado, tanto com *P. vivax* quanto por *P. falciparum*, em diferentes localidades da região amazônica (Consoli&Oliveira, 1994; Tadei *et al.*, 1998; 2000; Póvoa *et al.*; 2001; Santos *et al.*; 2005). Assim nossos resultados sugerem possível envolvimento do *An. nuneztovari* na transmissão de malária humana na área estudada e alertam para o papel deste, como possível vetor principal de malária humana na região amazônica brasileira.

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ Houve sucesso na obtenção da geração F1 de *An. nuneztovari* e *An. darlingi*;
- ✓ O *An. nuneztovari* e *An. darlingi* foram susceptíveis à infecção malárica;
- ✓ O *An. nuneztovari* foi mais susceptível à infecção aos plasmódios que o *An. darlingi*, quando observado número total de mosquitos positivos nas diferentes partes do corpo ou em ambas, tórax/cabeça ou abdômen;
- ✓ O tempo de desenvolvimento do ciclo dos plasmódios foi mais rápido que o esperado;
- ✓ *An. nuneztovari* é possível vetor de malária na área estudada.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, M; SOUZA, R. C.; VEIGA, M. E; FERREIRA, A. F.; ZIMMERMANN, R. H. Prevalence of *Plasmodium vivax* variants VK247 and *P. vivax* – like human malaria: a retrospective study in indigenous Indian population of Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 6, p. 628, 1998.
- AYRES, M.; AYRES, M. JR; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. Bio Estat versão 4.0 Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Publicações Avulsas Mamirauá. 272p. Acompanha CD-ROM para PC compatível com Windows 95, 98 e NT. Belém/PA: Sociedade Civil Mamirauá. Brasília/DF: CNPq, 2005.
- BUSTAMANTE, F. M. Distribuição geográfica e periodicidade estacional da malária no Brasil e sua relação com os fatores climáticos. Situação Atual do Problema. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 9, n. 1, p. 181-190, 1957.
- BRIEGEL, H.; HÖRLER, E. Multiple blood meal as a reproductive strategy in *Anopheles* (Diptera: Culicidae). **The Journal of Medical Entomology**, v. 30 (6), p. 975 – 985, 1993.
- BRUCE – CHWATT, L. J. The Malaria Parasites. In: BRUCE – CHWATT, L. J. (ed.). **Essencial Malariology**, Willian Heinemann, Medical Books, 1980, p. 10 – 34.
- BRUCE – CHWATT, L. J. History of malaria from prehistoric to eradication. In **Malaria and Practical of Malariology**. Wernsdorfer, W. H., McGregor, S. I., (eds). Edinburgh, Churchill Living – stone, p. 2 – 59, 1988.

- COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M.; A retrospective examination of mosquito infection on humans infected with *Plasmodium falciparum*. **American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63 (3), p. 366 -371, 2003.
- CONN, J. E.; PUERTAS, Y. R.; SEAWRIGHT, J. A. A new citotype of *An nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. **Journal of American Mosquitoes Control Association**, v. 9 (3); p. 294 – 301, 1993.
- CONN, J. E.; WILKERSON, R. C.; SEGURA, M. N. O.; SOUZA, R. T. L.; SCHILCHTING, C. D.; WIRTZ, R. A.; POVOA, M. M. Emergence of neotropical malaria vectors facilitated by human migration and changes in land use. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66 (1), p. 18 – 22, 2002.
- CONSOLI, R. A.; OLIVEIRA, R. L. Classificação das Principais Espécies de importância Sanitária. In: CONSOLI, R. A.; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, p. 17-92, 1994.
- DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R.; DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública** v. 1, p. 821-966, 1948.
- DEANE, L. M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 5-14., Suplemento II, 1986
- DEANE, L. M. Os grandes marcos da história do controle da malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, p. 12-22, Suplemento II. 1992.
- FERGUSON, H. M.; READ, A. R. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 256 – 260, 2002.

- FORATTINI, O. P. Família Culicidae. In: FORATTINI, O. P. (ed.). **Entomologia Médica**, São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962, p. 123 – 301.
- FORATTINI, O. P. Classe Insecta. In: FORATTINI, O. P. (ed.). **Culicidologia Médica**, São Paulo, USP, 1996, p. 123 – 190.
- FORATTINI, O. P. Culicidologia Médica, v. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002, p. 54 – 62, 292 e 321.
- GILLES, H. M. The Malaria Parasite. In: GILLES, H. M.; WARREL, D. A. (eds.). **Essencial Malariology**, London, Edward Arnold, p. 12 – 34, 1993.
- GOUAGNA, L. C.; MULDER, B.; NOUBISSI, E.; TCHUINKAM, T.; VERHAVE, J. P.; BOUDIN, C. The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory – infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. **Tropical Medicine and International Health**, v. 3 (1), p. 21 – 26, 1998.
- HAGAN, p., CHAUCHAN, V. Ronald Ross and the problem of malaria. **Parasitology Today**, 13 (8), p. 290 – 295, 1997.
- KLEIN, T. A.; LIMA, J. B. P.; TANG, A. T. Colonization and maintenance of *An. deaneorum* in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6 (3), p. 51 – 53, 1990.
- KLEIN, T. A., LIMA, J. B. P., TADA, M. S. Comparative susceptibility of *Anophele* mosquitoes in Rondônia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 45 (4), p. 436 – 470, 1991.
- LAISON, R. A. A. A protozoologist in Amazonia: Neglected parasites, with particular reference to members of Coccidia (Apicomplexa). **Ciência e Cultura: Journal of Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 4, p. 81 – 93, 1992.

- LAL, A. A.; PATTERSON, P. S.; SACCI, J. B.; VAUGHAN, J. A.; PAUL, C.; COLLINS, W. E.; WIRTZ, R. A.; AZAD, A. F. Anti – mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiples species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. **PNAS**, v. 98, n. 9, p. 5228 – 5233, 2001.
- LAVERAN, A. Paludisme et Trypanosomiase. **Baillière & Fils**, Paris, 1905.
- LEE, H. W.; CHO, S. H.; SHIN, E- H.; LEE, J. S.; LEE, J – S.; CHAI, J – Y.; LEE, S – H.; KIM, T. S. Experimental infection of *Anopheles sinensis* with Korean isolates of *Plasmodium vivax*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 177 – 183, 2001.
- MANGUINS, S.; ROBERT, D. R.; ANDRE, R. G. REJMANKOVA, E.; HAKRE, S. Characterization of *An. darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitants in Belize, Central America. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 205 – 211, 1996.
- MARKLER, M. T. & GIBBINS, B. Laboratory Diagnosis of Malaria. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 11, p. 941 – 950, 1991.
- MARQUEZ, A. C.; GUTIERREZ, H. C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 91-108, Suplemento III, 1994.
- MARTENS, P.; HALL, L. Malaria on the move: Human movement and malaria transmission. **Emerging Infections Diseases**, v. 6, n. 2, 2000, p. 103 – 109.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/ GERÊNCIA TÉCNICA DE MALÁRIA (SVS/MS/CGPNM). **Avaliação Epidemiológica da Malária, segundo local do diagnóstico. Brasil, 2003 – 2004.** (Emitido em Fevereiro/ 2005).

- MOTTA, E. G. E. Fatores determinantes da situação da malária na Amazônia. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, p. 27-32, 1992. Suplemento II.
- OLIVEIRA – FERREIRA, J.; OLIVEIRA, L. R.; DEANE, L. M.; DANIEL – RIBEIRO, C. T. Feeding preferences of *An. darlingi* in malaria endemic áreas of Rondônia state – northwestern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 601 – 602, 1992.
- OMS. 2005. World Malaria Report 2005. Disponível em < www. who.int >. Acesso em janeiro de 2006.
- OPAS – CONSEJO DIRECTIVO DE LA ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUDE, 41. Informe de lê situacion de los Programas de malária em lãs Américas (com base de dados de 1998). Washington; p. 1 – 35, 1999.
- PÓVOA, M. M.; MACHADO, R. L. D.; SEGURA, M. N.; VIANA, G. R.; VASCONCELOS, A.; CONN, J. E. Infectivity of malaria vector mosquitoes: correlation of positivity between ELISA and PRC/ELISA test. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 107 – 107, 2000.
- PÓVOA, M. M.; WIRTZ, R. A.; LACERDA, R. N. L.; MILES, M. A; WARHURST, D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapa, Amazon region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96 (2), p. 179 – 184, 2001.
- PÓVOA, M. M.; SOUZA, R. T. L.; LACERDA, R. N. L.; SANTA ROSA, E.; GALIZA, D.; SOUZA, J. R.; WIRTZ, R. A.; SCHLICHTING, C. D.; CONN, J. E. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *Anopheles darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 (2), p. 163 – 168, 2006.

- REY, L. Os Plasmódios e a Malária: I. Os parasitos. In REY, L. (ed). **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 286 – 297.
- RICCIARDI, I. R. Entomologia Aplicada. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Virologia, 1978.
- RÜA, G. L.; QUIÑONES, M. L.; VÉLEZ, I. D.; ZULUAGA, J. S.; ROJAS, W.; POVEDA, G.; RUIZ, D. Laboratory stimulation of effects of increasing temperatures on the duration of gonotrophic cycle of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 (5), p. 515 – 520, 2005.
- RUBIO – PALIS, Y.; CURTIS, C. F.; GONZÁLES, C.; WIRTZ, R. A. Host choice of anopheline mosquitoes in a malaria endemic area of western Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology**, 8, p. 275 – 280, 1994.
- SALLUM, M. A. S., SCHULTZ, T. R., WILKERSON, R. C. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicinae) based on morphological characters. **Annals of Entomology Society of America**, 93 (4), p. 1 – 31, 2000.
- SANTOS, R. L. C.; SUCUPIRA, I. M. C.; LACERDA, R. N. L.; FAYAL, A. S.; PÓVOA, M. M. Inquérito entomológico e infectividade durante epidemia de malária no município de Anajás, Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38 (2), p. 202 – 204, 2005.
- SECTAM – BELÉM – PARÁ: 2000. Disponível em: [www.ambientebrasil.com.br](http://www.ambientebrasil.com.br)  
Acessado em 9 de agosto de 2004.
- SEGURA, M. N. O. **Estudo do *An (Nys) albitarsis* Arribalzága, 1878 (Diptera: Culicidae) como vetores de malária numa mesma área de transmissão e caracterização de espécies do complexo *albitarsis***, 1998. 152 f. Tese (Mestrado

em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pará, Museu Emílio Goeldi, Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Belém.

SILVA, A. N. M. **Susceptibilidade Natural e Experimental do *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) e Colonização em Laboratório.** 2001. 100 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pará, Museu Emílio Goeldi, Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Belém.

SILVA, A. N. M.; SANTOS, C. C. B.; LACERDA, R. N. L.; SANTA ROSA, E.P.; SOUZA, R. T.L.; GALIZA, D.; SUCUPIRA, I., M., C.; CONN, J. E.; PÓVOA, M.M. Laboratory Colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.43, n. 1, p. 107 – 109, 2006.

SIVEP – MALÁRIA. Disponível em [www.saude.gov.br/sivep\\_malaria](http://www.saude.gov.br/sivep_malaria). Acesso em 04 de abril de 2006.

TADEI, W. P. Ecologic observation on anofeline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 2, p. 225-235, 1998.

TADEI, W. P.; DUTARY – THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42 (2), p. 87 – 94, 2000.

WILKERSON, R. C.; PARSONS, T. J.; KLEIN, T. A.; GAFFIGAN, T. V.; BERGO, E.; CONSOLIM, J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *An albitarsis* from Paraguay, Argentina and Brazil. **Journal of Medicine Entomology**, v. 32, p. 697 – 704, 1995.

WIRTZ, R. A.; ZAVALA, F.; CHAROENVIT, Y.; CAMPBELL, G. H.; BURKOT, T. R.; SCHENEIDER, I.; ESSER, K. M.; BEAUDOIN, R. L.; ANDRE, R.G. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 65, n. 1, p. 39 – 45, 1987.