

AURISTELA RAMOS DO CARMO

**IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES ALIMENTARES DE MOSQUITOS
TRANSMISSORES DA MALÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA PELA
TÉCNICA DE *BLOODMEAL ELISA***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia 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 Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marinete Marins Póvoa

Belém-Pará

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES ALIMENTARES DE MOSQUITOS
TRANSMISSORES DA MALÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA PELA
TÉCNICA DE *BLOODMEAL ELISA***

AURISTELA RAMOS DO CARMO

Belém-Pará

2006

AURISTELA RAMOS DO CARMO

IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES ALIMENTARES DE MOSQUITOS
TRANSMISSORES DA MALÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA PELA TÉCNICA
DE *BLOODMEAL ELISA*

Dissertação apresentada ao curso 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: Dr^a. Marinete Marins Póvoa
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas

Banca Examinadora: Dr^a. Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira
Departamento de Histologia, Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará

Dr. Inocêncio Gorayeb
Departamento de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi

Dra. Roseli La Corte dos Santos
Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Sergipe

Suplente: Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva
Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas

Belém, 07 de julho de 2006

"É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e água ser constituída por dois gases altamente inflamáveis. A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra à aparência efêmera das coisas."

Karl Marx

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele e a fé que tenho Nele, não conseguiria chegar aonde cheguei.

Agradeço especialmente a Dra. Marinete Póvoa, por ter me aceitado como aluna e confiado em mim.

Aos meus amigos de trabalho: Izis Sucupira, Giselle Rachid, Ediclei do Carmo, Ivone Ayres e Mônica Moraes Obrigada por tornar o ambiente de trabalho agradável e pelo companheirismo.

Aos técnicos do IEC: Tadeu Lessa, Raimundo Lacerda, Deocleciano Galiza, Abud, Edivaldo Santa Rosa, Zé Maria e Zé Mário, por estar sempre dispostos a ajudar.

A minha família, especialmente meus pais, Stenio do Carmo e Lucinea Ramos, pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

Aos meus colegas de turma: Renato Fernandes, Juciclayton Tavares, Andréa Luciana, Victor Riker, Bruna Tamegão, Maria Helena Chaves e Karolina Kalil, pela amizade e momentos de alegria.

RESUMO

O ensaio imunoenzimático para identificação de repastos sangüíneos apresenta especificidade até nível de gênero, sensibilidade para identificação de repastos sangüíneos parciais e detecção de repastos múltiplos. Foram identificadas as fontes alimentares de 82% dos anofelinos coletados em campo. Foram testados seis anticorpos monoclonais (humano, suíno, cão, bovino, rato e galinha) e destes, apenas o anti- IgG bovino apresentou instabilidade. Obteve-se 55,7% (519/932) dos repastos positivos para sangue humano, o que demonstra, a preferência alimentar destes anofelinos por humanos. Dos 206 mosquitos que apresentaram repasto único, 27,6% foi em humanos. O *Anopheles darlingi* apresentou 41% dos repastos em humanos e o Índice de Sangue Humano (HBI) no intradomicílio foi de 0,71. *An. marajoara* apresentou 51,3% dos repastos em humanos, embora tenha sido encontrada em grande quantidade no ambiente extradomiciliar e apresentando HBI no intradomicílio de 0,76. O *An. nuneztovari* foi a espécie mais abundante, apresentando comportamento exofílico e antropofílico, com 53,8% de repastos em humano e HBI no intradomicílio de 0,65. O método ELISA Sanduíche está implantado, identificando a fonte alimentar das espécies de anofelinos coletadas em campo, exceto para bovino. É a primeira vez que esta técnica é utilizada para determinação de repastos sangüíneos em anofelinos na região Amazônica brasileira. É importante a determinação da fonte alimentar das espécies de anofelinos no sentido de caracterizar o comportamento antropofílico e assim associá-las ou não à transmissão de malária.

ABSTRACT

The immunoenzymatic assay for the bloodmeal identification has specificity till genus level, sensitivity for the identification of partial bloodmeal and detection of multi bloodmeal. It was detected the blood source of 82% of all mosquitoes specimens collected at the transmission area. We had testes six monoclonal antibodies for human, pig, dog, bovine, rat and chicken, and from them, only the bovine one had been unstable. It was obtained 55,7% (519/932) of the blood source for human, which demonstrated, these mosquitoes preference for human blood. From the 206 mosquitoes that had just a unique blood source, 27,6% were in human. The *Anopheles darlingi* had fed in human (41%) and his human bloodmeal index (HBI) indoor was 0,71. *An. marajoara* had presented 51,3% of the bloodmeal in humans, although had been collected in large amount outdoor and showed the HBI indoor of 0,76. The *An. nuneztovari* was the specie more abundant, demonstrating an exophilic and anthropophilic behavior, with 53,8% of blood source in humans and the HBI indoor of 0,65. The ELISA test is established, identifying the blood source of the anopheline mosquitoes collected in the malaria transmission area, except for bovine. This is the first time that this technique is being used for the determination of the blood source in anopheline mosquitoes in Brazilian Amazonia. It is very important the determination of the blood source of the anopheline species in order to characterize their anthropophilic behavior and to associate them or not with the malaria transmission.

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA

A malária humana é uma doença parasitária que tem como agente etiológico um protozoário do gênero *Plasmodium* e é transmitida ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. Foi descrita como uma doença por Hipócrates no séc IV a.C., mas a natureza parasitária da infecção só foi revelada em 1880, quando Laveran encontrou grânulos de pigmentação escura dentro de hemácias ao examinar o sangue de pacientes com malária (Bruce-Chwatt, 1988).

Giovani Grassi, em 1895, descreveu o ciclo evolutivo do *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* e comprovou experimentalmente que os mosquitos do gênero *Anopheles* eram capazes de transmitir a malária (Bruce-Chwatt, 1988).

Em 1897, Ronald Ross, cientista britânico que trabalhava na Índia, descobriu que os mosquitos eram os transmissores da doença. Ele alimentou mosquitos em pacientes com malária e concluiu que havia envolvimento do inseto no ciclo de vida do *Plasmodium* (Krettli & Miller, 2001; Hagan & Chauchan, 1997).

Todo ano, 300 milhões de pessoas se infectam e 2 milhões morrem em consequência da malária no mundo (Bell *et al.*, 2004; Gaur *et al.*, 2004) No Brasil ocorrem 500.000 casos de malária por ano e o maior número de casos é verificado na Amazônia Brasileira. (MS/SVS,2004).

1.1.1. O *Plasmodium*

Os agentes etiológicos da malária humana pertencem ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Eucoccidiida, Família Plasmodiidae e Gênero *Plasmodium* (Lainson, 1992). Os plasmódios são parasitos intracelulares obrigatórios que durante seu ciclo infectam eritrócitos do hospedeiro vertebrado.

Existem pelo menos 150 espécies de plasmódios, sendo que destas apenas quatro parasitam o homem: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*. Destas, somente as três primeiras são encontradas no Brasil.

O parasito possui um ciclo complexo que envolve dois hospedeiros, um vertebrado (homem) e um invertebrado (mosquito fêmea do gênero *Anopheles*) (Figura 1). No hospedeiro vertebrado ocorre a fase assexuada do parasito, denominada esquizogonia. A infecção do hospedeiro invertebrado determina a fase sexuada do parasito, chamada esporogonia. (Gaur *et al.*, 2004; Mota & Rodriguez, 2001; Ghosh *et al.*, 2000)

O ciclo inicia-se quando o mosquito, carregando os esporozoítos em suas glândulas salivares, exerce a hematofagia no homem. Os esporozoítos atravessam a pele, entram na circulação, localizam o fígado e invadem os hepatócitos (Krettli & Miller, 2001). Após a replicação e desenvolvimento dos parasitos nos hepatócitos, passando pelas formas de trofozoíta e esquizonte, o hepatócito se rompe, liberando as formas merozoítas. Esses merozoítas invadem os eritrócitos, onde também se diferenciam em trofozoíta e esquizonte, fazendo com que o eritrócito se rompa e libere novos merozoítas. Alguns merozoítas passam por uma diferenciação sexual para formar os gametócitos, que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor. O ciclo sangüíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas nas infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e a cada 78 horas, nas infecções pelo *P. malariae* (Gaur *et al.*, 2004; Mota & Rodriguez, 2001).

O desenvolvimento dos plasmódios dentro do mosquito *Anopheles* envolve uma seqüência de etapas que incluem: a fertilização dos gametas, formação do oocineto, penetração pela matriz peritrófica e epitélio intestinal para formação de

oocistos e produção e migração dos esporozoítos até as glândulas salivares (Kaplan, 2001).

Após a fertilização, o zigoto se alonga e forma um oocineto móvel. Este atravessa a matriz peritrófica e a parede intestinal até alcançar a superfície externa, onde se fixa e forma o oocisto. Dentro do oocisto ocorre uma série de modificações que leva à formação de esporozoítos. Estes, com o rompimento dos oocistos, migram até as glândulas salivares através da hemolinfa (Sinden *et al.*, 1996; Sinden & Strong, 1978).

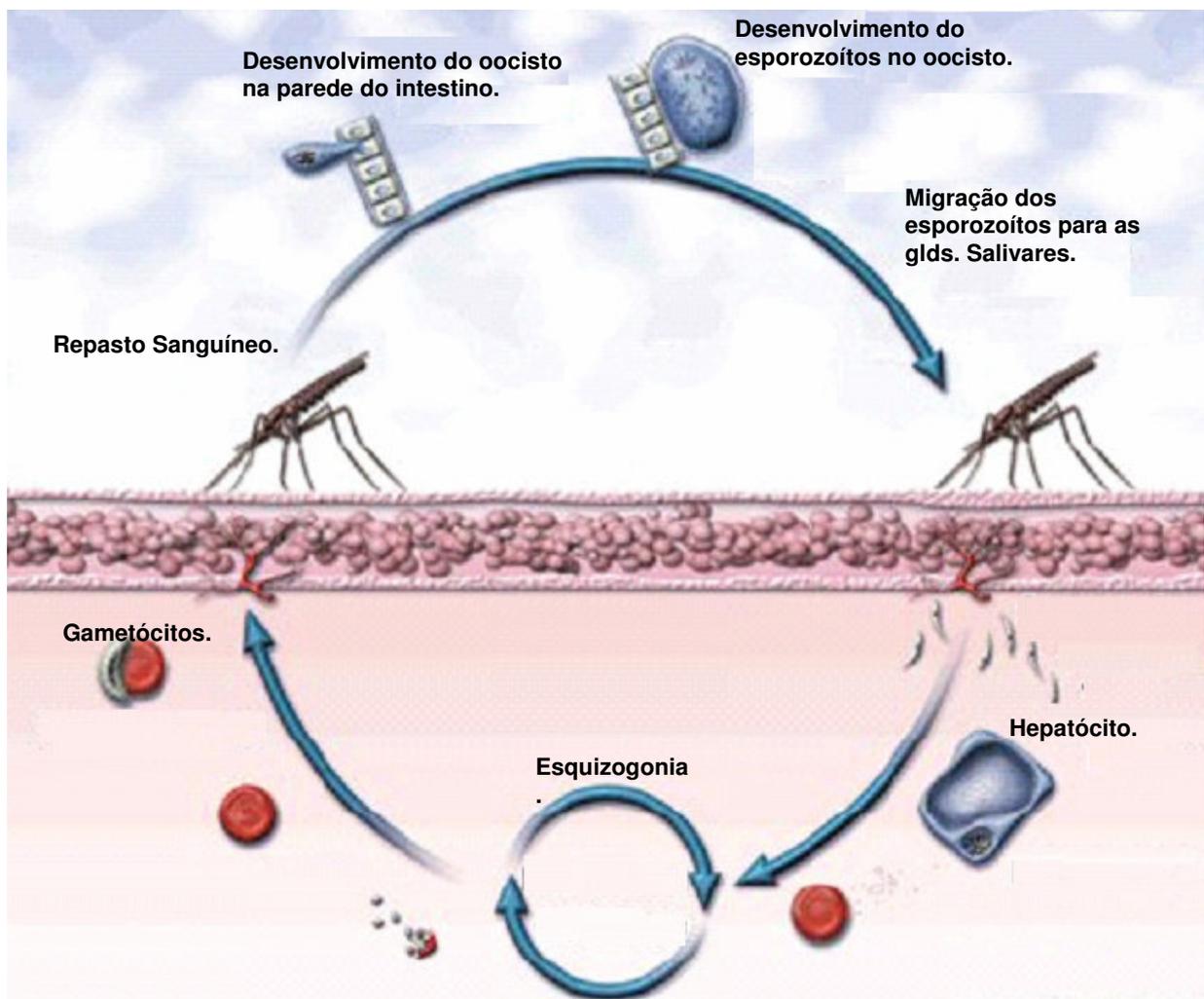


Figura 1: Desenho esquemático demonstrando o ciclo biológico do *Plasmodium*.

1.2. OS VETORES

Os mosquitos transmissores da malária pertencem à Classe Insecta, Ordem Díptera, Sub-Ordem Nematocera, Família Culicidae e Sub-Família Anophelinae. No gênero *Anopheles* encontram-se todas as espécies transmissoras conhecidas da malária humana (Forattini, 1962).

Na África, o *Anopheles gambiae* e o *An. funestus* são considerados os vetores mais eficientes, todavia, pode-se destacar o *An. arabiensis* que também apresenta grande importância na transmissão da malária neste continente (Collins & Besansky, 1994; Besansky *et al.*, 2004).

No Brasil, existem 54 espécies pertencentes ao gênero *Anopheles*, o qual é subdividido em 5 subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Kertessia*, *Stethomyia*, *Lophodomyia* e *Anopheles*. Os subgêneros que estão relacionados à transmissão da malária são o *Nyssorhynchus* e o *Kertessia* (Rosa-Freitas, 1998).

No subgênero *Nyssorhynchus*, as espécies encontradas infectadas pelo *Plasmodium* incluem *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis sensu lato*, *An. marajoara*, *An. deaneorum*, *An. oswaldoi*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus*. Segundo Rosa-Freitas *et al.* (1998) tais espécies encontradas naturalmente infectadas por *Plasmodium* não desempenham papel importante na manutenção da malária, visto que são espécies zoofílicas, exófilas, de baixa densidade e sua distribuição e frequência não coincidem com aquelas da doença, exceto *An. darlingi*. Esta é considerada a responsável pela maior parte da transmissão da malária, devido ao seu caráter antropofílico e suas altas taxas de infecção por *Plasmodium* (Arruda *et al.*, 1986; Oliveira-Ferreira, 1990; Klein *et al.*, 1991; Oliveira-Pereira & Rebelo, 2000; Póvoa *et al.*, 2001; Conn *et al.*, 2002).

Essa espécie é responsável pela manutenção da endemia, mesmo em baixas densidades vetoriais, uma vez que testes de precipitina relataram o envolvimento desta espécie com os casos de malária humana. As espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis* s.l também exercem papel importante na transmissão da doença (Rebelo *et al.*, 1997; Tadei & Thatcher, 2000; Póvoa *et al.*, 2001; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002).

Tadei & Thatcher (2000) fizeram um estudo sobre as espécies vetoras de malária no Estado do Amazonas e encontraram espécimes de *An. nuneztovari*, *An. triannulatus* e *An. albitarsis* positivos para *Plasmodium*.

A espécie *An. triannulatus* apresenta ampla distribuição e utiliza vasta variedade de criadouros, no entanto não tem sido considerada um bom vetor, pois é uma espécie de hábitos zoofílicos e exófilos e é pouco susceptível ao *Plasmodium* (Oliveira-Pereira e Rebelo, 2000; Klein *et al.*, 1991).

An. nuneztovari é encontrado somente na América do Sul, ainda não é considerado importante na transmissão no Brasil, mas é o vetor principal em certas regiões da Venezuela, além de apresentar importância vetorial na Colômbia, Peru, Bolívia e Suriname. Estudos realizados no oeste venezuelano mostraram que esta espécie é antropofílica, exófila e possui elevada capacidade vetorial (Moreno *et al.*, 2004; Rubio-Palis 2000; Rubio-Palis *et al.*, 1994; Rubio-Palis & Curtis 1992). Esta espécie é composta por três citotipos morfológicamente distintos: O citotipo A, que representa a seqüência cromossômica amazônica, o citotipo B, presente ao norte da Cordilheira dos Andes na Venezuela e Colômbia e o citotipo C que se restringe à oeste da Venezuela ao Sul da Cordilheira. A identificação do citotipo presente em cada região é de grande importância para o conhecimento do papel de transmissão

da malária, pois sabe-se que o citotipo A é o de menor importância epidemiológica e seus hábitos de picada diferem dos outros (Lounibos & Conn, 2000).

O complexo *albitarsis* compreende 4 espécies (*An. albitarsis sensu stricto*, *An. deaneorum*, *An. marajoara* e *An. albitarsis* espécie B, os quais podem ser diferenciados utilizando-se a técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction). Mais recentemente foi incluída uma espécie muito próxima ao *An. marajoara*: *An. albitarsis* E. Em certas regiões, como o Estado do Amapá, o *An. marajoara* aparece em maior quantidade que o *An. darlingi*, tornando-se assim uma ameaça real na transmissão da malária. Conn *et al.* (2002) em seu estudo sobre o papel do *An. marajoara* na transmissão, encontrou esta espécie em maior densidade e sua antropofilia foi evidenciada. Além disso, ela foi encontrada infectada por *Plasmodium* com mais frequência. Em Boa Vista, no Estado de Roraima, *An. albitarsis* E também foi encontrado em maior densidade e é considerado um importante vetor naquela área (Póvoa *et al.*, 2006; Lehr *et al.*, 2005; Cong & Wilkerson., 2005; Wilkerson *et al.*, 1995).

Baseado em estudos feitos nas décadas de 40 e 50, ficou estabelecido que ao longo da costa do território brasileiro, a malária é transmitida pelo *An. aquasalis* e nas outras áreas, o *An. darlingi* é o responsável principal pela transmissão. *An. albitarsis s.l.* e *An. braziliensis* são de importância secundária como vetores (Póvoa *et al.*, 2003).

Alguns autores têm considerado as espécies do complexo *albitarsis* como vetores principais em certas localidades. Embora o *An. albitarsis sensu stricto* seja considerado zoofílico, muitos autores relataram um comportamento antropofílico intenso deste mosquito, picando dentro e fora das casas, especialmente na ausência de animais de grande porte na área ao redor (Guimarães *et al.*, 2004).

Póvoa *et al.* (2001) em um estudo feito na região da Serra do Navio, Estado do Amapá, encontraram *An. albitarsis s.l.* em maior densidade nas localidades pesquisadas e positivos para as três espécies de *Plasmodium*, mostrando assim que essa espécie desempenha um papel relevante na epidemiologia da malária naquela área.

Muitas espécies neotropicais têm sido propostas como potenciais vetores baseado em estudos que utilizam ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e dissecação das glândulas salivares para a detecção dos parasitos. Dentre elas, pode-se destacar *An. oswaldoi*, *An. deaneorum*, *An. mediopunctatus*, *An. trianullatus*, *An. marajoara*, *An. braziliensis*, *An. nuneztovari* e mais recentemente *An. (Anopheles) neomaculipalpus*. Entretanto, como já foi citado, essas espécies ainda não são consideradas vetores primários, havendo necessidade de mais estudos para verificar o real papel destas espécies na transmissão (Moreno *et al.*, 2005; Conn *et al.*, 2002; Póvoa *et al.*, 2001; Tadei & Dutary-Thatcher, 2000; Rosa-Freitas, 1998; Branquinho, 1996; Arruda *et al.*, 1986).

1.2.1. Ciclo de desenvolvimento dos anofelinos

Os mosquitos são insetos holometábolos que passam por quatro estágios biológicos distintos: ovo, larva (com quatro instares), pupa e adulto (Figura 2). As fases de ovo, larva e pupa desenvolvem-se em águas doces e com suave correnteza. Entretanto, algumas espécies, como *An. melas*, *An. merus*, no oeste e leste da África e *Anopheles aquasalis*, nas Américas Central e do Sul, ovipõem em águas salinas. A maioria das espécies tem criadouros em águas continentais das mais variadas qualidades, volumes e tamanhos, permanentes ou temporárias (Marcondes, 2001; Forattini, 1962).

1.2.1.1. Os ovos

São ovais ou elípticos, possuem flutuadores, e têm simetria bilateral. São envolvidos por uma casca composta de 3 camadas: membrana fina vitelina interna, endocório endurecido e grosso e exocório (envoltório externo). Na extremidade anterior está a micrópila, orifício por onde o espermatozóide fecunda o óvulo.

1.2.1.2 As larvas

São formadas dentro dos ovos e quando estes eclodem, as larvas de primeiro estágio saem para o meio aquático. Têm aspecto vermiforme e possuem o corpo coberto por cerdas. Seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é composto de oito segmentos similares e o último diferenciado em lobo anal e sifão respiratório pouco desenvolvido. O aparelho bucal é do tipo mastigador-raspador.

1.2.1.3 Pupas

As pupas têm aspecto que as assemelha a uma vírgula. O corpo apresenta o cefalotórax e o abdômen. Não apresentam aparelho bucal, pois nessa fase elas não se alimentam. Respiram pelas trombetas respiratórias presentes no cefalotórax.

1.2.1.4. Os adultos

Os adultos, machos e fêmeas, emergem das pupas. O anofelino possui o corpo coberto por cerdas, dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça encontram-se os olhos compostos, as antenas (pilosas nas fêmeas e plumosas nos machos), os palpos (longos em relação à probóscide), além do aparelho bucal tipo

picador. No tórax encontram-se as pernas e as asas. Grande parte dos órgãos internos encontra-se no abdômen.

Os mosquitos alimentam-se basicamente de carboidratos, porém as fêmeas fecundadas necessitam de sangue para que ocorra a maturação dos ovos (Marcondes, 2001). Existem espécies que preferem alimentar-se em animais (zoófilas) e geralmente são encontradas em ambiente extradomiciliar. Outras têm preferência pelo sangue humano e são capturadas com frequência no peridomicílio e intradomicílio.

O acasalamento pode ocorrer isoladamente em pequenos espaços físicos, ou em conjunto, com formação de enxames.

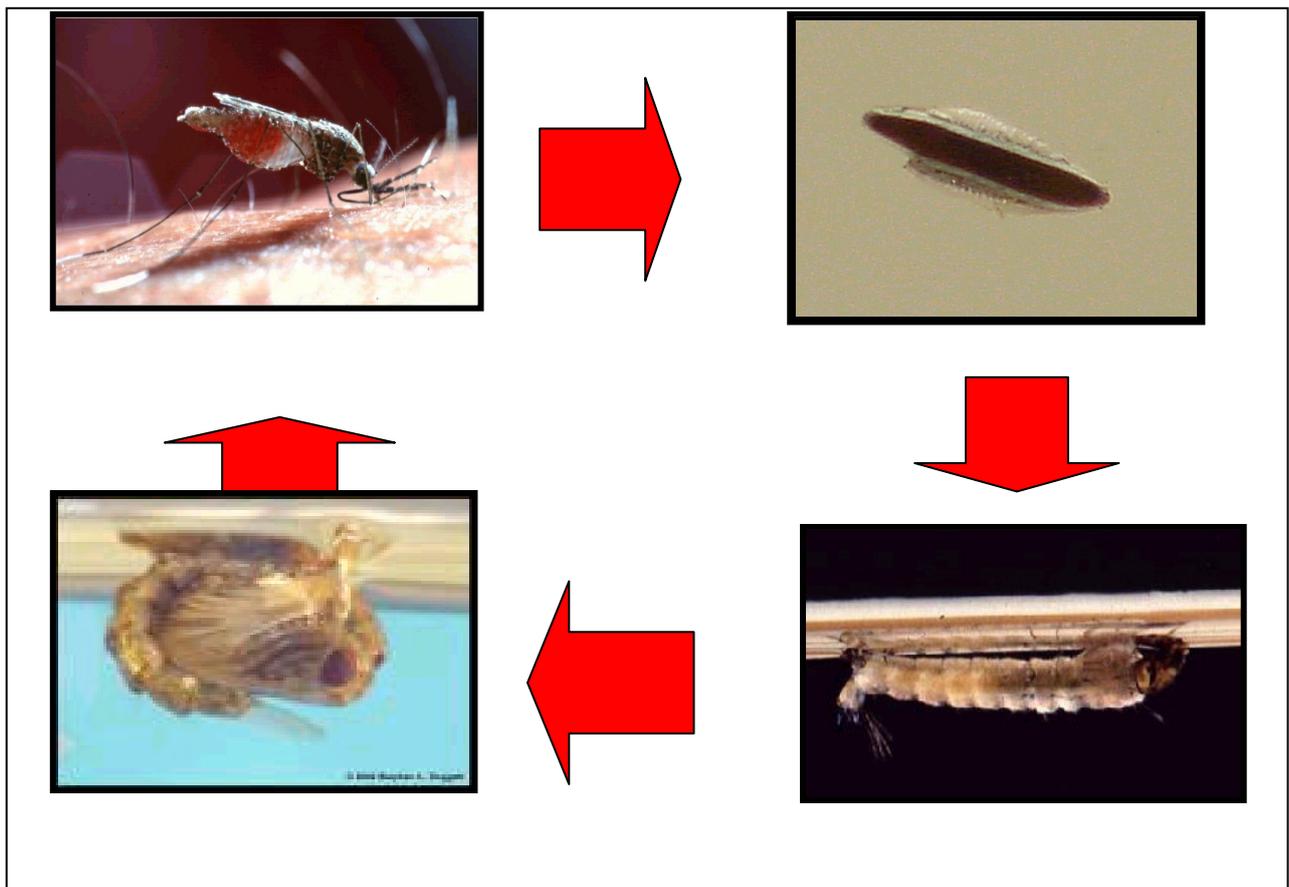


Figura 2: O ciclo biológico dos culicídeos possui quatro estádios: ovo, larva, pupa e adulto.

1.3 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS PARA A DETECÇÃO DE FONTE ALIMENTAR DE ARTRÓPODES

O padrão alimentar dos anofelinos faz parte de um conjunto de informações necessárias para o entendimento e avaliação epidemiológica do comportamento de espécies em áreas de transmissão de malária. Esse conhecimento é de grande importância para se adotar medidas adequadas de controle da doença (Marassá *et al.*, 2004; Flores-Mendoza, 1996).

Os hábitos de repastos mistos de artrópodes vetores em dois ou mais animais é um importante componente na epidemiologia da malária. Logo é importante investigar os hábitos de repasto dos vetores usando uma ferramenta sensível que utilize antígeno específico com o fim de identificar os animais nos quais foi realizado o repasto sanguíneo. O teste de precipitina foi muito utilizado para detectar repastos mistos e uma grande proporção destes foi relatada para algumas espécies. Sênior-White (1952) encontraram 12% de repastos mistos em *An. aquasalis*. Boreham & Garret-Jones (1973) relataram que 8,9% dos repastos eram mistos em *An. sacharovi* (Burkot *et al.*, 1988).

As técnicas imunológicas para a detecção de sangue ingerido em artrópodes têm sido utilizadas desde os primórdios de 1900, quando a técnica da precipitina para a determinação da fonte alimentar em mosquitos e outros insetos foi adaptada. Embora esta tenha sido a técnica mais utilizada, sua sensibilidade e especificidade são baixas, além de requerer grande quantidade de sangue, o que dificulta a sua utilização com insetos de pequeno porte (Marassá *et al.*, 2004).

A hemaglutinação passiva apresenta melhor sensibilidade e especificidade que os testes de precipitina, entretanto é um teste demorado e laborioso. O teste de aglutinação em látex, embora mais fácil de executar, não é

capaz de fazer distinção entre hospedeiros próximos e é menos sensível que o teste da precipitina, além de apresentar um custo elevado. A fixação de complemento foi avaliada para a identificação de fonte alimentar de Tsé-Tsé, mas é uma técnica que exige pessoas bem treinadas e mesmo assim é passível de problemas técnicos (Service *et al.*, 1986).

Um dos problemas encontrados na identificação de fonte alimentar de repastos sangüíneos é a quantidade da amostra de sangue ingerida pelo inseto, que é muito variável. Por exemplo, ceratopogonídeos e flebotomíneos ingerem uma pequena quantidade de sangue (0,01 a 0,1 mg) e esta quantidade requer técnicas muito sensíveis para a identificação da fonte alimentar, enquanto que os triatomíneos podem ingerir mais que 400 mg de sangue. Outro fator é que os testes utilizados usam somente uma parte do sangue ingerido, visto que o processo digestivo inicia rapidamente (Massará *et al.*, 2004).

A técnica imunoenzimática foi inicialmente desenvolvida para o diagnóstico de pacientes portadores de malária, sendo posteriormente adaptada para o estudo de hábito alimentar de culicídeos. Edrissian & Hafizi (1980) foram os primeiros a modificar o protocolo de Voller *et al.* (1974) para identificação de repastos em *An. stephensi* alimentados em voluntários e animais de laboratório. Dessa maneira, diversas modalidades do método foram introduzidas, dependendo particularmente da concentração de sangue ingerido, contido nas amostras e das informações que se deseja obter no estudo (Massará *et al.*, 2004).

1.3.1. Ensaio Imunoenzimático de Repasto Sanguíneo (*Bloodmeal* ELISA)

O teste de ELISA é um teste imunológico que envolve uma enzima, um anticorpo ou um antígeno. É utilizado para detectar substâncias que têm propriedades antigênicas, principalmente proteínas.

Chow *et al.* (1993) reconheceram o potencial da técnica de ELISA para a identificação dos animais dos quais os mosquitos, e outros importantes artrópodes vetores obtiveram seu repasto sanguíneo. A versatilidade das técnicas de ELISA pode ser vista pelo número de diferentes protocolos existentes e a escolha de um deles depende de fatores como a concentração do antígeno nas amostras sanguíneas.

1.3.1.1. ELISA Método Direto

Neste método, o antígeno presente na amostra testada é adsorvido diretamente na superfície da microplaca. Um anticorpo primário, conjugado a uma enzima reage diretamente com o antígeno ligado à superfície. A quantidade de proteína ligada pode ser visualizada através da adição de um substrato enzimático. Este protocolo é empregado quando o anticorpo conjugado à enzima está disponível e o antígeno a ser detectado está presente na amostra em grande quantidade (Chow *et al.*, 1993).

1.3.1.2. ELISA Método Indireto

Quando o anticorpo primário conjugado não está disponível, o ELISA método indireto pode ser usado. Neste caso, um anticorpo primário não conjugado reage com o antígeno e um segundo anticorpo conjugado reage com o primeiro anticorpo (Chow *et al.*, 1993).

1.3.1.3. Método *Sanduiche*

Este é o método mais sensível e específico e requer quantidades pequenas de antígenos. Anticorpos adsorvidos na superfície da microplaca capturam seletivamente o antígeno da amostra sangüínea, o qual é diretamente detectado por um anticorpo específico conjugado a uma enzima (Chow *et al.*, 1993).

As estratégias para o uso do ELISA para a identificação de repastos sanguíneos dependem dos objetivos do estudo. Edrissian *et al.* (1985) usaram o método direto para testar 5000 *Anopheles* coletados no Irã para repasto em humanos. Burkot & DeForliart (1982) usaram o método indireto para identificar 16 fontes alimentares, incluindo animais silvestres (Beier *et al.*, 1988).

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo Geral

- Implantar a técnica do “Bloodmeal ELISA” no laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Implementar a técnica do “Bloodmeal ELISA” pelo método *Sanduíche* em laboratório
- Identificar as fontes alimentares de mosquitos do gênero *Anopheles* coletados nos Estados do Pará e Amapá.
- Avaliar a aplicabilidade do “Bloodmeal ELISA”

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

Os mosquitos em repouso pós-alimentação natural utilizados no estudo foram capturados com aparelho capturador à bateria durante coletas realizadas pela equipe do Instituto Evandro Chagas nos Estados do Pará e do Amapá. No laboratório, todos os mosquitos coletados foram colocados em placa de vidro e levados à lupa entomológica para a identificação morfológica pela chave dicotômica de Faran & Linthicum (1981). Foram utilizados 932 mosquitos pertencentes às seguintes espécies: *An. (Nyssorhynchus) darlingi*, *An.(Nys) nuneztovari*, *An. (Nys) marajoara*, *An. (Nys) triannulatus*, *An. (Nys) intermedius*, *An. (Nys) brasiliensis* e *An. (Nys) oswaldoi*.

2.1.1. Preparo das amostras

Os abdômens foram triturados em 50 µl de PBS + 0,1% de Timerosal. Após a trituração, 300 µl da mesma solução foi acrescentado às amostras.

Para o controle negativo do teste foram utilizados mosquitos machos ou somente a solução de trituração. Para controles positivos foram utilizados soros dos seguintes animais: cão, bovino, roedor, frango, humano e suíno. Visto que o “bloodmeal ELISA” é muito sensível, a diluição dos soros utilizada foi de 1:300.000.

2.2. SENSIBILIZAÇÃO DAS MICROPLACAS

Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Dos 96 poços, foram utilizadas somente os 60 poços internos. A primeira fileira de poços foi utilizada para os controles positivos. Os últimos 5 poços da última fileira foram utilizados

para os controles negativos e o restante dos poços para as amostras a serem analisadas.

Antes de sensibilizar as microplacas foram preparadas as soluções dos anticorpos de captura a serem utilizadas.

O quadro 1 mostra as quantidades de solução de Anticorpos Monoclonais (MoAbs) (KPL Laboratories) em 3,2 mL de PBS (sem Tween), necessárias para a preencher 60 poços, sendo 50 μ L/poço.

Quadro 1: Quantidades de solução de anticorpo monoclonal utilizada para cada tipo de hospedeiro.

Espécies	Quantidade de MoAb (μ L) necessária	Concentração de MoAb (μ g)/ μ L PBS	Concentração de MoAb (μ g)/poço
Humano	26,6	0,00415	0,208
Boi	27,7	0,00432	0,216
Galinha	3,3	0,0005	0,026
Cachorro	13,3	0,002	0,104
Porco	26,6	0,00415	0,208
Roedor	26,6	0,00415	0,208

Foi adicionado 50 μ L da solução de MoAb de captura por poço. Por causa da evaporação, foi adicionado 50 μ L de PBS por poço. As placas foram cobertas e incubadas à temperatura ambiente por 1 hora (ou durante a noite).

2.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Após a sensibilização das microplacas, o conteúdo dos poços foi aspirado e o excesso de líquido foi retirado batendo-se as placas contra um papel absorvente. Depois, cada poço foi preenchido até o máximo de 250 μ L de Tampão de Bloqueio. As microplacas foram então incubadas à temperatura ambiente por 1 hora.

Depois da incubação, o Tampão de Bloqueio foi aspirado em todos os poços e 50 μ L dos controles positivos e negativos, assim como das amostras foram adicionados aos poços restantes. As placas foram cobertas para prevenir a evaporação e incubadas em temperatura ambiente por 2 horas.

Após o período de incubação, era feita a lavagem dos poços com PBS-Tween por 3 vezes.

A preparação do anticorpo monoclonal/ conjugado peroxidase (KPL Laboratories) e, 3,2 mL de Tampão de Bloqueio foi feita conforme mostra o quadro 2.

Quadro 2: Quantidades de anticorpo monoclonal conjugado à peroxidase

Espécies	Quantidade de conj. (μ L) Necessária	Concentração de conj. (μ g)/ μ L BB	Concentração de MoAb (μ g)/poço
Humano	1,6	0,00125	0,0625
Boi	1,6 (p/ 4mL de BB), depois retirar 374 μ L e acrescentar a 4,6 ml	0,00125	0,0625
Galinha	1,8	0,0002	0,01
Cachorro	2,6	0,0004	0,02
Porco	2,6	0,0004	0,02
Rato	2,6	0,0004	0,02

Após a preparação do conjugado foram adicionados 50 μ L/poço e Tampão bloqueador nos poços externos. As placas foram incubadas novamente por mais 1 hora. Depois o conteúdo dos poços foi aspirado e as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween.

Foram então adicionados 100 μ L de solução de substrato/poço interior e nova incubação em temperatura ambiente por 15 minutos foi feita. A leitura das

placas foi feita em espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda de 405 nm.

2.4. CÁLCULO DO CUT-OFF

Toda amostra que apresentou um número maior que a média mais 3 desvios padrão dos controles negativos foi considerada positiva.

2.5. ÍNDICE DE SANGUE HUMANO (HBI)

Foi calculado o índice de sangue humano para cada espécie principal de anofelino no ambiente intradomiciliar. Esse índice é calculado dividindo-se o número de exemplares positivos para repasto com sangue humano (independente se único ou misto) pelo total de repastos identificados (independente do animal) (Burkot *et al.*, 1988).

2.6. TESTE ESTATÍSTICO

Para comparar os valores de índices de sangue humano encontrados para as três espécies, foi utilizado o Teste Binomial e o programa utilizado foi o BioEstat

3.0.

3. RESULTADOS

Foram testados 932 mosquitos, destes, 804 foram coletados no ambiente extradomiciliar e 128 no intradomicílio. A espécie mais freqüente foi *An. nuneztovari*, que apresentou um total de 582 espécimes (Tabela 1). Foi observada a presença dos seguintes animais nas áreas de coleta: boi, cão, porco, mucura (gambá), galinha, cavalo e búfalo.

Tabela 1: Número de anofelinos capturados no intra e extradomicílio

Espécie	Intradomicilio	Extradomicilio	Total
<i>An. darlingi</i>	41	125	166
<i>An. marajoara</i>	16	140	156
<i>An. nuneztovari</i>	68	514	582
<i>An. triannulatus</i>	1	17	18
<i>An. intermedius</i>	1	2	3
<i>An. braziliensis</i>	1	5	6
<i>An. oswaldoi</i>	0	1	1
TOTAL	128	804	932

Do total de 932 mosquitos testados, 765 (82%) apresentaram resultado positivo para sangue de pelo menos um dos seguintes animais: roedor, galináceo, canino, suíno e humano. Os 167 mosquitos restantes não foram positivos para nenhuma das espécies de animal testadas. Não foram obtidos resultados para sangue bovino.

A tabela 2 mostra a freqüência de anofelinos alimentados com sangue de cada vertebrado testado.

Dos 765 anofelinos positivos, 26,9%(206/765) haviam se alimentado em apenas uma fonte sanguínea e 73 % (559/765) apresentaram repastos mistos.

Tabela 2: Frequência de anofelinos coletados que apresentaram repasto positivo, por animal testado.

Espécie	TOTAL	
	N	%
Humano	519	55,7 (519/932)
Suíno	451	48,4 (451/932)
Canino	300	32,2 (300/932)
Roedor	368	39,5 (368/932)
Galina	210	22,5 (210/932)

Dos 206 anofelinos que apresentaram repasto único, 27,6% (57/206) alimentaram-se somente em humanos, 24,7% (51/206) em suíno, 23,8% (49/206) em cão, 13,6% (28/206) em roedor e 10,1 % (21/206) em galinha (Figura 1).

Foi calculada a percentagem de repastos positivos para cada animal por espécie de anofelino (Tabela 3). *An. darlingi* apresentou 41% (68/166) dos repastos em humanos, 40,4% (67/166) em suínos, 42,2% (70/166) em cães, 29,5% (49/166) em roedor e 18,7% (31/166) em galinha (Figura 2).

No caso da espécie *An. marajoara* 51,3 (80/156) dos repastos identificados foram em humanos, 45,5% (71/156) em cães, 46,8% (73/156) em roedor, 47,4% (74/156) em suínos e 25% (39/156) em galinha. (Figura 3).

Para a espécie *An. nuneztovari* foram identificados 53,8% (313/582) dos repastos em humanos, 37,8% (220/582) em roedor, 49,1% (286/582) em suínos, 44,5% (259/156) em cães e 21,8% (127/582) em galinha (Figura 4).

Tabela 3: Frequência de repastos positivos para sangue de cada animal por espécie de anofelino no intra e extradomicílio.

Vertebrado	<i>An. darlingi</i>			<i>An. marajoara</i>			<i>An. nuneztovari</i>		
	E	I	%	E	I	%	E	I	%
Homem	40	28	41% (68/166)	67	13	51,3 (80/156)	267	46	53,8 (313/582)
Suíno	38	29	40,4% (67/166)	63	11	47,4 (74/156)	239	47	49,1 (286/582)
Canino	52	18	42,2 (70/166)	62	9	45,5 (71/156)	225	34	44,5 (259/582)
Roedor	27	22	29,5 (49/166)	62	11	46,8 (73/156)	165	55	37,8 (220/582)
Galinha	21	10	18,7 (31/166)	38	1	25 (39/156)	105	22	21,8 (127/582)

E: extradomicílio I: intradomicílio

Observa-se nas figuras 2, 3 e 4 que a proporção de mosquitos positivos para sangue humano coletados no intra e extra foi semelhante para o *An. darlingi*, enquanto que para as outras duas espécies estudadas foi significativamente maior no extra domicílio.

O Índice de Sangue Humano (HBI) por espécie de mosquito foi calculado para o intradomicílio, dividindo-se o número de exemplares positivos para repasto com sangue humano (independente se único ou misto) no intradomicílio pelo total de repastos identificados (independente do animal) (tabela 4). A Figura 5 mostra a comparação do HBI entre as três principais espécies de anofelinos encontradas no intradomicílio. *An. darlingi* apresentou HBI= 0,72, enquanto que *An. marajoara* e *An. nuneztovari* apresentaram HBI igual a 0,76 (p=0,35) e 0,65 (p=0,22) respectivamente, o que não é estatisticamente significativo. Foi verificada a presença de repastos múltiplos nas três principais espécies de anofelinos estudadas. Os repastos múltiplos mais frequentes foram: homem/suíno; homem/cão; homem/roedor; homem/suíno/cão; homem/suíno/roedor; homem/cão/roedor; homem/suíno/cão/roedor; homem/suíno/cão/galinha/roedor.

Tabela 4: Índice de sangue Humano (HBI) para as três principais espécies de anofelinos no intradomicílio.

Espécie	Total (todos repastos identificados)	Nº (repasto humano)	HBI
<i>An. darlingi</i>	39	28	0,72
<i>An. marajoara</i>	17	13	0,76
<i>An. nuneztovari</i>	71	46	0,65

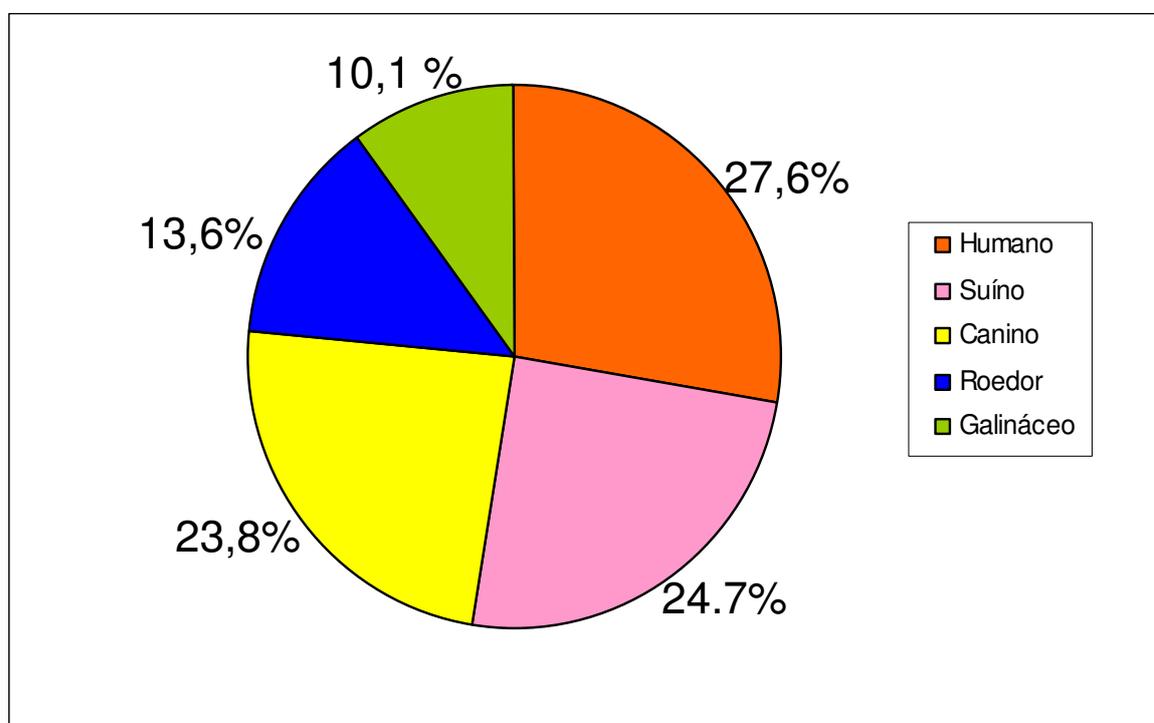


Figura 3: Identificação do sangue ingerido por anofelinos que haviam se alimentado em apenas uma fonte sangüínea.

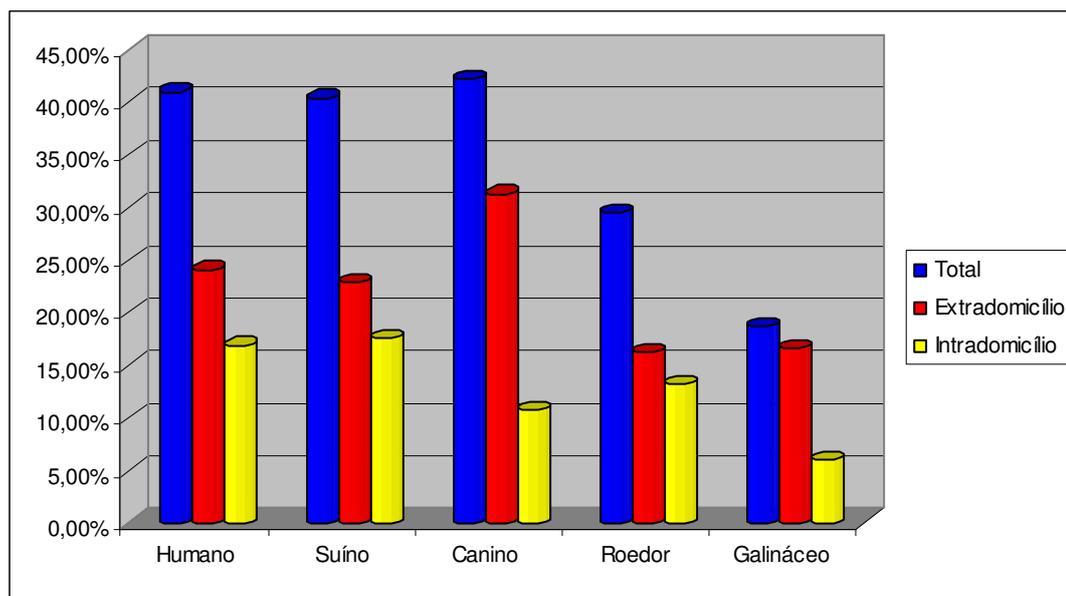


Figura 4: Identificação do sangue ingerido por mosquitos da espécie *An. darlingi* em relação ao total de espécimes coletados.

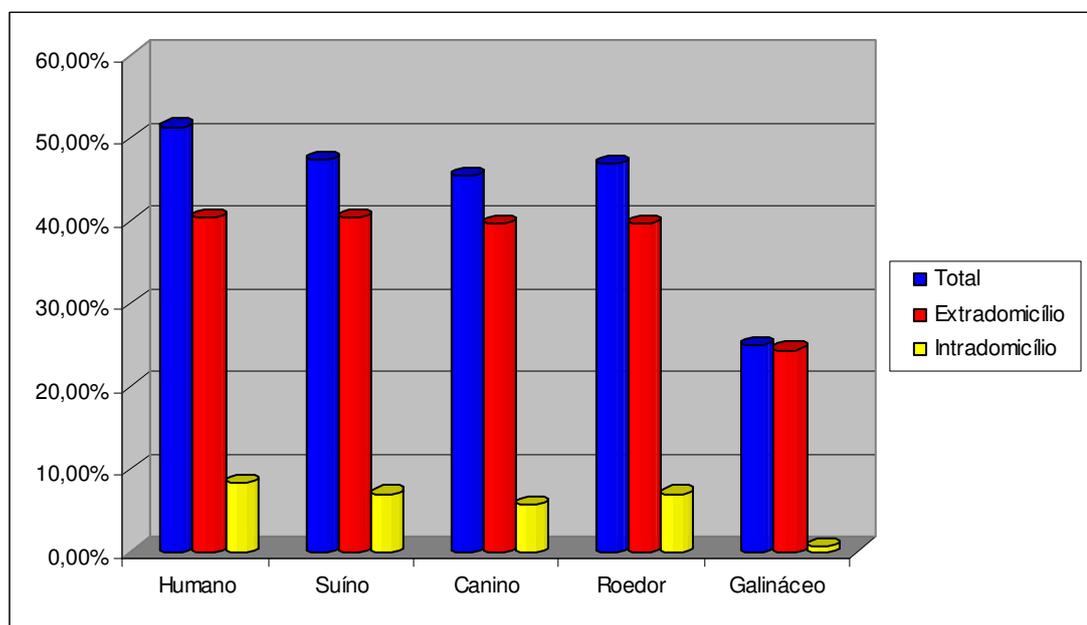


Figura 5: Identificação do sangue ingerido por mosquitos da espécie *An. marajoara* em relação ao total de espécimes coletados.

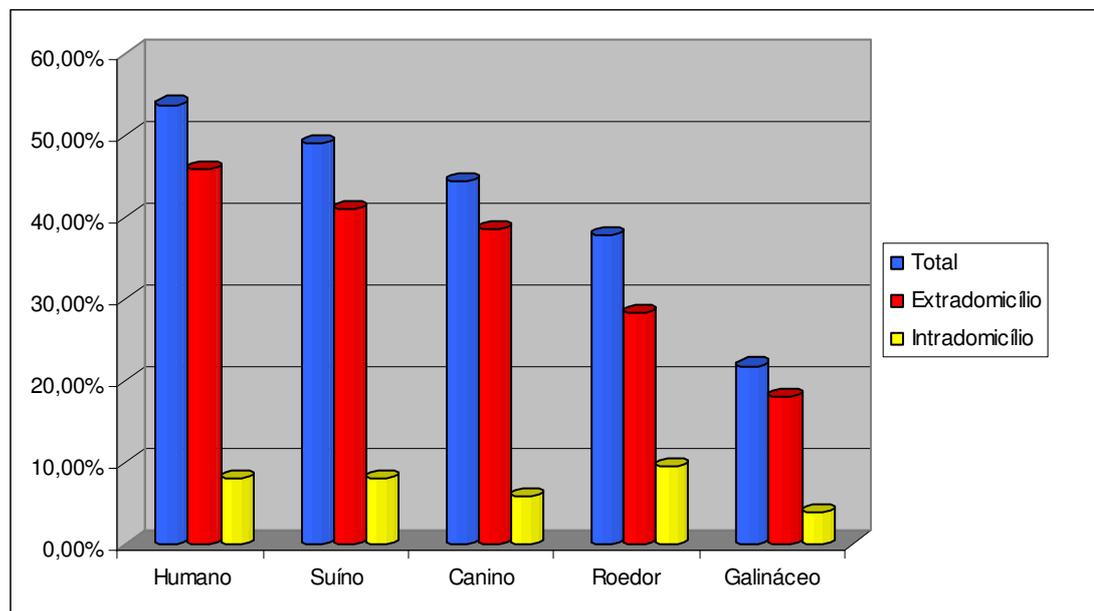


Figura 6: Identificação do sangue ingerido por mosquitos da espécie *An. nuneztovari* em relação ao total de espécimes coletados.

4. DISCUSSÃO

O uso do ensaio imunoenzimático como ferramenta de identificação de repastos sangüíneos oferece vantagens como, especificidade até nível de gênero, sensibilidade que requer apenas repastos sangüíneos parciais para a identificação e detecção de repastos múltiplos (Burkot *et al.*, 1981).

O conhecimento dos hábitos hematofágicos e da preferência alimentar dos anofelinos é de grande relevância, tanto em estudos sobre controle quanto nos de transmissão. A frequência de alimentação em humanos influencia a probabilidade dos mosquitos entrarem em contato com gametócitos e conseqüentemente se tornarem infectados por *Plasmodium*. Os vetores bem sucedidos são aqueles que se alimentam preferencialmente em humanos e secundariamente em gado ou outros animais domésticos (Mbogo *et al.*, 1993; Hunter & Bayly, 1991; Garret-Jones *et al.*, 1980).

O Método ELISA *Sanduiche* é o mais indicado para a detecção de sangue ingerido por pequenos dípteros, pois apresenta elevada especificidade e é capaz de detectar pequenas quantidades de amostras sangüíneas (Marassá *et al.*, 2006). Service *et al* (1986) utilizaram esse método para identificação de repastos sangüíneos de insetos e este se mostrou superior aos métodos direto e indireto em termos de precisão e sensibilidade. Chow *et al.* (1993) analisaram diferentes protocolos de ELISA para determinação de fontes alimentares de *Aedes aegypti* e constataram que o Método *Sanduiche* foi o mais eficiente.

Este estudo obteve sucesso na identificação das fontes alimentares de anofelinos coletados em campo. Foi possível identificar a fonte alimentar em 82% dos anofelinos estudados. Foram testados seis anticorpos monoclonais (anti-IgG humano, anti-IgG suíno, anti-IgG cão, anti-IgG bovino, anti-IgG rato e anti- IgG

galinha) e destes apenas o anti- IgG bovino apresentou instabilidade. A causa dessa instabilidade ainda é desconhecida, mas acredita-se que sua elevada sensibilidade teria comprometido os resultados. Rubio-Palis *et al.* (1994) utilizaram o ELISA para detecção de sangue humano e bovino e encontraram reação positiva mais forte para bovino do que para humano e seus valores de absorbância foram mais altos do que para humanos. Essa forte reação positiva também foi observada neste trabalho. A possível explicação para esse fato é que as taxas de digestão são diferentes para cada tipo de sangue e que a para sangue bovino é mais baixa que a de outras espécies animais.

Beier *et al.* (1988) em seu estudo realizado com anofelinos capturados no Quênia identificaram 94,6% dos repastos dos 4338 mosquitos coletados, entretanto, Burkot *et al.*(1988) identificaram 86% dos repastos dos 3181 anofelinos coletados em Papua Nova Guiné. Neste trabalho, foram identificados 82% dos repastos, e este percentual está na média em relação aos outros estudos. Contudo, o fato de não terem sido obtidos resultados com relação ao bovino pode ter influenciado nesse resultado. Além disso, o teste foi feito para apenas seis espécies de animais. Também se deve considerar que a determinação da fonte alimentar depende principalmente da taxa de digestão do sangue ingerido pelo mosquito. Geralmente, em condições tropicais, o sangue é digerido entre 24 e 48 horas. O volume de sangue ingerido e a espécie de mosquito estudada também influenciam (Chow *et al.*, 1993). Neste estudo, foram utilizados mosquitos capturados em campo, e portanto o tempo de digestão do repasto sangüíneo é desconhecido.

Primeiramente foi realizada uma análise dos resultados totais, mostrando a frequência de anofelinos alimentados com sangue de cada grupo de vertebrados testado. Obteve-se 55,7%(519/932) dos repastos positivos para sangue humano, o

que demonstra que, de forma geral, os anofelinos coletados nas localidades de estudo alimentaram-se preferencialmente em humanos.

Dos 206 mosquitos que apresentaram repasto único, 27,6% se alimentaram em humanos. Esse resultado é tão relevante quanto o resultado anterior, visto que apesar de os anofelinos apresentarem preferência por determinados animais, eles também se alimentam de acordo com a oferta. Embora outros animais de maior porte estivessem presentes nas áreas de coleta, a maioria de repastos únicos foi feita em humanos. Nessas áreas haviam muitos suínos, bovinos e cães, o que justifica o grande número de repasto também em porcos e cães, pelas três principais espécies de anofelinos encontradas. Cães também foram muito comuns e foi o animal mais picado por *An. darlingi*.

An. darlingi foi a espécie mais encontrada dentro das casas quando analisada para todos os animais testados e apresentou alto grau de antropofilia, como esperado. Considerando o total de espécimes coletados, dos 41% de repastos identificados em humanos, 16,9% provavelmente ocorreram no intradomicílio (Ver figura 2). Esse aspecto é muito importante, visto que esta espécie é a principal transmissora da malária, e a mais encontrada dentro das casas, o que favorece a transmissão (Conn *et al.*, 2006). O Índice de Sangue Humano (HBI) no intradomicílio para esta espécie foi de 0,71.

An. marajoara apresentou 51,3% dos repastos em humanos, no entanto, essa espécie foi encontrada em grande quantidade no ambiente extradomiciliar (Ver Figura 3). Esta espécie apresentou HBI no intradomicílio de 0,76. Os achados neste estudo estão de acordo com resultados de estudos feitos anteriormente que relataram esta espécie como vetora de malária em áreas do estado do Amapá (Póvoa *et al.*, 2006; Conn *et al.*, 2002). Essa informação é muito importante, pois apesar da

maioria dos repastos terem provavelmente acontecido fora das casas, a alta densidade populacional aumenta o risco de transmissão da malária.

An. nuneztovari foi a espécie mais abundante e apresentou, segundo os resultados, comportamento exofílico e antropofílico. Foram encontrados 53,8% do total de repastos positivos para sangue humano e seu HBI no intradomicílio foi de 0,65. Esta espécie é descrita na literatura como predominantemente zoofílica no Brasil e de importância secundária na transmissão da malária (Lounibos & Conn, 2000; Oliveira-Pereira, 2000; Tadei & Thatcher, 2000). Diferentemente de outros estudos, os resultados achados neste trabalho mostraram que esta espécie apresenta um comportamento antropofílico na região, embora também se alimente em outros animais, com menor frequência. Por isso, mais estudos devem ser feitos para avaliar o real papel desta espécie na transmissão da malária em áreas de transmissão no Brasil.

As três principais espécies de anofelinos estudadas mostraram comportamento preferencialmente antropofílico, se alimentando em outras espécies animais em menor frequência. É importante frisar que essas espécies, com exceção do *An. nuneztovari*, já são consideradas transmissoras da malária na região. A alta densidade de *An. nuneztovari* é determinante nesses resultados, pois mesmo não sendo considerado vetor primário, estão presentes em grande número, facilitando e aumentando o contato homem-vetor.

O grande número de repastos múltiplos encontrado neste trabalho mostra a importância de novos estudos sobre o comportamento hematofágico dos anofelinos, visto que o repasto em vários hospedeiros facilita o contato do mosquito com o homem e conseqüentemente a transmissão da doença.

No laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas, o método ELISA Sanduíche está implantado, sendo eficiente em identificar a fonte alimentar das espécies de anofelinos coletadas em campo. Com exceção do anticorpo monoclonal anti-IgG bovino, o ensaio imunoenzimático funcionou corretamente para todos os animais testados. É a primeira vez que esta técnica é utilizada para determinação de repastos sanguíneos em anofelinos na região Amazônica brasileira. É importante a determinação da fonte alimentar das espécies de anofelinos no sentido de caracterizar o comportamento antropofílico e assim associá-las ou não à transmissão de malária.

4. CONCLUSÕES

- A técnica de *Bloodmeal* ELISA para identificação da fonte alimentar de mosquitos foi implantada com sucesso no Laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas;
- As três principais espécies de anofelinos coletados tiveram suas fontes alimentares identificadas dentre as espécies de animais utilizadas;
- As espécies de anofelinos testadas apresentaram preferência por sangue humano;
- *An. nuneztovari* apresentou comportamento antropofílico nas áreas estudadas;
- Foi verificado o múltiplo repasto nas três principais espécies de mosquitos estudadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, M; CARVALHO, M. B.; NUSSENZWEIG, R. S; MARACIC, M.; FERREIRA, A. W.; COCHRANE, A. H. Potencial vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, 35(5): 873-881.1986.
- BELL, A. S. & RANFORD-CARTWRIGHT L.C. A real-time PCR assay for quantifying *Plasmodium falciparum* infections in the mosquito vector. **International Journal for Parasitology**, 34:795–802. 2004.
- BEIER, J. C.; PERKINS, P. V.; WIRTZ, R. A.; KOROS, J.; DIGGS, D.; GARGAN, T. P.; KOECH, D. K. Bloodmeal identification by direct enzyme-linked assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. **Journal of Medical Entomology**, 25(1): 9-16. 1988.
- BESANSKY, N. J.; HILL, C. A.; CONSTATINI, C. No accounting for taste: host preference in malaria vectors. **Trends in Parasitology**, 2004.
- BOREHAM, P. F.; GARRETT-JONES, C. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Favre). **Bulletin of World Health Organization**, 48(5): 605-14. 1973.
- BRANQUINHO M. S.; ARAUJO M. S.; NATAL D.; MARRELLI M. T.; ROCHA R. M.; TAVEIRA F. A.; KLOETZEL J. K. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 90(3):233.1996.

- BRUCE-CHWATT, L. J. History of malaria from prehistory to eradication. **In; Malaria: Principles and practice of malariology.** Wernsdorfer, W.H.; McGregor, S.I. (eds). Edinburgh, Churchill Living-Stone, p. 2-59.1988.
- BURKOT, T. R.; GOODMAN, W. G.; DEFOLIART, G. R. Identification of mosquito blood meals by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 30(6): 1336-1341. 1981.
- BURKOT, T. R.; DEFOLIART, G. R. Bloodmeal sources of *Aedes triseriatus* and *Aedes vexans* in a southern Wisconsin forest endemic for La Crosse encephalitis virus. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, 31(2):376-81.1982.
- BURKOT, T. R.; GRAVES, M. P.; PARU, R.; LAGOG, M. Mixed blood feeding by the malaria vectors in the *Anopheles punctulatus* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, 25(4):205-213. 1988.
- CHOW, E.; WIRTZ, R. A.; SCOTT, T. W. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 9(2): 196-204. 1993.
- COLLINS, F. H. & BESANSKY, N. J. Vector biology and the control of malaria in Africa. **Science**, 264: 1874-1875. 1994.
- CONN, J. E.; WILKERSON, M.; SEGURA, M. N O.; DE SOUZA, R .T. L.; SHILICHTING, C. D.; WIRTZ, R. A.; PÓVOA, M. M. Emergence of a new tropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, 66(1): 18-22. 2002.
- CONN, J. E.; VINEIS, J. H; BOLLBACK, J. P.; ONYABE, D. Y.; WILKERSON R. C.; PÓVOA, M. M. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, 74(5):798-806. 2006.

- CONG, L.; WILKERSON, R. C. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100(5): 495-500. 2005.
- CÔNSOLI, R. A. G. B. & OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil**, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 214 páginas. 1994.
- EDRISSIAN, G. H.; HAFIZI, A. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in identification of *Anopheles* bloodmeals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 76:54-56. 1982a.
- EDRISSIAN G. H.; MANOUCHEHRY A.V.; HAFIZI, A. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of the human blood index in anopheline mosquitoes collected in Iran. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 1(3):349-52. 1985.
- FARAN, M.E & LINTHICUM, K.J. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). **Mosquitoes Systematics**, 13:1-81. 1981.
- FLORES-MENDOZA, C.; CUNHA, R. A.; ROCHA, D. S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Identification of food sources of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) by precipitin test in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 30(2):129-34. 1996.
- FORATTINI, O.P. Família Culicidae. In: **Entomologia Médica**. Forattini, O.P. (ed.) São Paulo, Faculdade de Higiene e saúde Pública, p. 123-301. 1962 a.
- GAUR, D.; MAYER, G. D. C; MILLER, L.H. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal for Parasitology**, 34(13-14): 1413-1429. 2004.

- GARRET-JONES, C.; BOREHAM, P. F. L.; PANT, C. P. Feeding habits of anophelines (Diptera: Culicidae) in 1971-78, with reference to the human blood index: a review. **Bulletin of Entomological Research**, 70: 165-185. 1980.
- GHOSH, A.; EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: Hopes for the new century. **Parasitology Today**, 16(5): 196-201. 2000.
- GUIMARÃES, A. E.; GENTILE, C.; ALENCAR, J.; LOPES, C. M.; MELLO, R. P. Ecology of Anophelinae (Diptera: Culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goiás, Brazil. 1- Frequency and climatic factors. **Cadernos de Saúde Pública**, 20(1): 291-302, 2004.
- HAGAN, P & CHAUCHAN, V. Ronald Ross and the problem of malaria. **Parasitology Today**, 13(8): 290-295. 1997.
- HUNTER, F. F.; BAYLY, R. ELISA for identification of blood meal source in black flies (Diptera: Simuliidae). **Journal of medical Entomology**, 28(4): 527-532. 1991.
- KAPLAN, R. *Plasmodium gallinaceum*: ookinete formation and proteolytic enzyme dynamics in highly refractory *Ae. aegypti* populations. **Experimental Parasitology**, 98, 115-122. 2001.
- [KLEIN, T. A.](#); [LIMA, J. B.](#); [TANG, A. T.](#) Biting behavior of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 24(1):13-20. 1991.
- KRETTLI, A.U & MILLER, L. A sporozoite runs through it. **Current Biology**, 11: 9-12. 2001.
- LAINSON, R. A protozoologist in Amazonia: Neglected parasites, with particular reference to members of the Coccidia (Protozoa: Apicomplexa). **Ciência e**

Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 44: 81-93. 1992.

LEHR M. A.; KILPATRICK C. W.; WILKERSON, R. C.; CONN, J. E. cryptic species in the *Anopheles albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between RAPD-PCR identification and analysis of mtDNA *COI* sequences. **Ann. Ent. Soc. Amer**, 98: 908-917. 2005.

LOUNIBOS, L. P.; CONN, J. E. Malaria vector heterogeneity in South America. **American Entomologist**, 46: 238-249. 2000.

MARASSÁ, A. M.; CONSALES, C. A.; GALATI, E. A. B. Padronização da técnica do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(6): 441-446. 2004.

MARASSÁ, A. M.; CONSALES, C. A.; GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(2): 183-186. 2006.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo, Atheneu, 2001. 432 p.

MBOGO, C. N. M.; KABIRU, E. W.; MUIRURI, S. K.; NZOVU, J. M.; OUMA, I. G.; BEIER, J. C. Bloodfeeding behavior of *Anopheles gambiae* S.L. and *Anopheles funestus* in Kilifi district, Kenya. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 9(2): 225-227. 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Internet: www.saude.gov.br. Acessado em 24/01/2005.

- MORENO, J.; RUBIO-PALIS, Y.; SÁNCHEZ, V.; MARIANY, D. Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón, 1940 (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela y sus implicaciones eco-epidemiológicas. **Entomotropica**, 19(1): 55-58. 2004.
- MORENO, J. E.; RUBIO-PALIS, Y.; PAEZ, E.; PEREZ, E.; SANCHEZ, V.; VACCARI, E. *Anopheles (Anopheles) neomaculipalpus*: a new malaria vector in the Amazon basin? **Medical Veterinary Entomology**, 19(3):329-32. 2005.
- MOTA, M. M. & RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by Apicomplexa parasites. **Microbes and Infection**, 3: 1123-1128. 2001.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R.; TEVA, A.; DEANE, L. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, 43(1):6-10. 1990.
- OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. & REBELO, J. M. M. Espécies de *Anopheles* no município de Pinheiro (Maranhão), área endêmica de malária. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(5): 443-450. 2000.
- PÓVOA, M. M.; CONN, J. E.; SCHICHTING, C. D.; AMARAL, J. C. O. F.; SEGURA, M. N. O.; DA SILVA, A. N. M.; DOS SANTOS, C. C. B.; LACERDA, R. N. L.; DE SOUZA, R. T. L.; GALIZA, D.; SANTA ROSA, E. P.; WIRTZ, R. A. Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anophles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 40(4):379-86. 2003.
- PÓVOA, M. M.; DE 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 *An. darlingi* in human malaria

transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 101(2): 163-168. 2006.

PÓVOA, M. M.; WIRTZ, R. A.; LACERDA, R. N. L.; MILLES, M. A.; WARHURST, D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96(2): 179-184. 2001

ROSA-FREITAS, M. G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; CARVALHO-PINTO, C. J.; FLORES-MENDOZA, C.; SILVA-DO-NASCIMENTO, T. F. Anophelines species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 93(5): 651-655.1998.

REBELO, J. M. M.; SILVA, A. R. ; FERREIRA, L. A.; VIEIRA, J. A. *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) e a malária em Buriticupu- Santa Luzia, pré- Amazônia Maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(2): 107-111. 1997

RUBIO-PALIS, Y.; CURTIS, C. F. Biting and resting behavior of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. **Medical Veterinary Entomology**. 6:325-334. 1992.

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 Veterinary Entomology**, 8:275-280. 1994.

RUBIO-PALIS, Y. *Anopheles (Nyssorhynchus) de Venezuela. Taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica.* Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental “Dr. Arnoldo Gabaldon” y el Proyecto Control de Enfermedades Endémicas. Maracay, Venezuela, 2000. 120 p.

- SÊNIOR-WHITE, R. A. Studies on the bionomics of *Anopheles aquasalis* Curry, 1932. Part III. **Indian Journal of Malariology**, 6(1):29-72. 1952.
- SERVICE, M. W.; VOLLER, A.; BIDWELL, D. E. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of bloodmeals of haematophagous insects. **Bulletin of Entomological Research**, 76: 321-330. 1986.
- SILVA-VASCONCELOS, A.; KATÓ, M. Y .N.; MOURÃO, E. N.; DE SOUZA, R. T. L.; LACERDA, R. N. L.; SIBAJEV, A.; TSOURIS, P.; PÓVOA, M. M.; MOMEN, H.; ROSA-FREITAS, M. G. 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(2): 151-161. 2002.
- SINDEN, R. E.; BUTCHER, G. A.; BILCKER, O.; FLECK, S. L. Regulation of the infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. **Advanced Parasitology**, 38: 54-117. 1996.
- SINDEN, R. E. & STRONG, K. An ultrastructural study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 72 (5): 477-491. 1978.
- 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(2): 87-94. 2000.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.; HULDT, G.; ENGVALL, E. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. **Bulletin of World Health Organization**, 51(2):209-11. 1974.
- VOORHAM, J. Intrapopulation plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera: Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 36(1): 75-80, 2002.

WILKERSON RC, PARSONS TJ, KLEIN TA, GAFFIGAN TV, BERGO E, CONSOLIM J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 32:697-704. 1995.