

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

Ecologia de *Culex quinquefasciatus* e de *Culex nigripalpus* no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil.

Gabriel Zorello Laporta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

**Área de concentração:
Epidemiologia**

Orientadora: Prof. Dr. Maria Anice Mureb Sallum

**São Paulo
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ecologia de *Culex quinquefasciatus* e de *Culex nigripalpus* no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil.

Gabriel Zorello Laporta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

**Área de concentração:
Epidemiologia**

Orientadora: Prof. Dr. Maria Anice Mureb Sallum

**São Paulo
2007**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na sua reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Aos meus avós maternos,
Duvaldo e Maria e paternos,
Angelo (in memorian) e Glória,
pelo amor dedicado à Família.

Aos meus pais, José Luís e
Márcia, pelo amor dedicado na
minha formação como homem,
cidadão e pesquisador.

À minha irmã Juliana, pelo amor
dedicado em momentos
importantes da minha vida.

À minha mulher Ana, pelo
recente amor despertado em
nossas vidas que nos impulsiona.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Maria Anice Mureb Sallum, orientadora dessa dissertação, pela dedicação ao desenvolvimento da pesquisa em todas as etapas com muita inteligência, experiência, paciência, amizade e honestidade.

À Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo por manter as estruturas, física e pessoal, compatíveis com um programa de pós-graduação de bom nível nacional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida a Gabriel Zorello Laporta (processo nº 06/53061-3) e pelo Projeto Temático concedido à Maria Anice Mureb Sallum (processo nº 05/53973-0).

À Organização Mundial da Saúde pelo Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais concedido à Maria Anice Mureb Sallum (processo nº A50252).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento de Científico e Tecnológico (CNPq) pelo Projeto Universal concedido à Maria Anice Mureb Sallum (processo nº 472485/2006-7).

Ao Wagner Bernardo, responsável pelo Parque Ecológico do Tietê, pela permissão do desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários do Parque Ecológico do Tietê, pelo profissionalismo durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

À pesquisadora Dr. Maria Stela Branquinho, pela coordenação do laboratório para a realização dos testes de hábito alimentar de *Culex* sp.

À Dr. Helene Mariko Ueno, pelas sugestões e dicas inteligentes durante o exame de qualificação que nortearam o desenvolvimento da pesquisa posteriormente.

À Dr. Roseli La Corte dos Santos, pelas observações inteligentes sobre os cuidados metodológicos da pesquisa.

Ao Dr. Mauro Toledo Marrelli, pelas sugestões sobre clareza e concisão da linguagem científica da dissertação.

À Dr. Regiane Maria Tirone de Menezes, pelas sugestões em etapas dessa pesquisa.

À Dr. Rosely dos Santos Malafronte, pela participação da banca de defesa da dissertação como membro suplente.

Ao Dr. Marcelo de Paula Corrêa, pelo interesse em participar de pesquisas de ecologia de mosquitos.

Ao Silvio, João, Joel, Wilson e Valter, do departamento de transportes da FSP/USP, pela colaboração no transporte de pessoas e equipamentos para a área de coleta de mosquitos.

Às minhas amigas Elaine, Thaís e Priscila, pela realização do teste de ELISA indireto nas amostras de fêmeas ingurgitadas de *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus*.

Às minhas amigas, Maysa e Sandra, pela colaboração na triagem de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* em uma das etapas do estudo de Marcação-Soltura –Recaptura.

À minha amiga Luana, pela boa convivência que tivemos no desenvolvimento do programa de pós-graduação.

Ao Prof. Délsio Natal, pelo profissionalismo dedicado à produção dessa dissertação.

Ao Dr. Paulo Urbinatti, pela ajuda na preparação dos equipamentos para a coleta de campo dessa pesquisa.

À Prof. Iná, pelas sugestões nos estudos de Paridade e de Marcação-Soltura-Recaptura de *Culex quinquefasciatus*.

Ao técnico Aristides, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa no laboratório de Culicidologia.

À Dr. Márcia Bicudo, pelas sugestões durante o estudo de Marcação-Soltura-Recaptura.

Ao Daniel Flores, pela ajuda na produção de imagens digitais de ovários de *Cx. quinquefasciatus*.

Aos alunos de Biologia da Fundação Santo André, pelo trabalho de campo realizado no PET durante a aplicação do protocolo de Marcação-Soltura-Recaptura.

A todos que contribuíram, diretamente ao indiretamente, com o desenvolvimento dessa pesquisa.

O Mosquito

O mundo é tão esquisito:
Tem mosquito.

Por que, mosquito, por que
Eu... e você?

Você é o inseto
Mais indiscreto
Da Criação
Tocando fino
Seu violino
Na escuridão.

Tudo de mau
Você reúne
Mosquito pau
Que morde e zune.

Você gostaria
De passar o dia
Numa serraria —
Gostaria?

Pois você parece uma serraria!

(Vinícius De Moraes, Obras Poéticas, 1968)

RESUMO

Introdução - *Culex quinquefasciatus* é um mosquito sinantrópico que causa incômodo à população humana e é relacionado com a transmissão de nematóides ou arbovírus em áreas endêmicas, respectivamente, do litoral brasileiro e da América Central ou do Norte. *Culex nigripalpus* é um mosquito hemi-sinantrópico que possui a capacidade de se dispersar para as áreas antrópicas e transmitir *Saint Louis Virus* e *Equine Encephalitis Virus*, respectivamente, na América do Norte e Venezuela. **Objetivo** - Caracterizar o hábito alimentar de *Culex nigripalpus* e a densidade, a sobrevivência e o hábito alimentar de *Culex quinquefasciatus* no Parque Ecológico do Tietê (PET), São Paulo. **Métodos** - O PET é uma Área de Preservação Ambiental com animais residentes ou migratórios. As amostras de mosquitos adultos foram coletadas, mensalmente, em quatro áreas no PET, durante um ano e por meio de aspirador à bateria. O método de ELISA indireto foi empregado para a identificação do hospedeiro que é fonte alimentar ao mosquito. A densidade da população de *Cx. quinquefasciatus* foi estimada pelo método de marcação, soltura e recaptura na vegetação da margem de um canal no PET. Amostras de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* desse local foram dissecadas ou acompanhadas em laboratório para estimativa da taxa de sobrevivência. **Resultados** - A proporção de repastos sangüíneos de *Cx. quinquefasciatus* e de *Cx. nigripalpus* foi, respectivamente, 6,5 e 8,3% em humanos, 18,8 e 27,7% em cães, 7,4 e 2,3% em galinhas, 2,8 e 9,0% em ratos, 3,2 e 8,3% em múltiplos hospedeiros e 67,7 e 60,9% em hospedeiros não identificados. *Human Blood Index* para *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* foi, respectivamente, 0,20 e 0,17. *Feeding Index* entre os hospedeiros homem/cão, homem/galinha e homem/rato foi, respectivamente, 0,35, 0,63 e 2,65 para *Cx. quinquefasciatus* e 0,30, 2,56 e 1,05 para *Cx. nigripalpus*. A distribuição de repastos sangüíneos teve associação significativa estatisticamente com as fêmeas de *Cx. nigripalpus* em estádio de Sella 2 coletadas em todas as

áreas do PET. A densidade de *Cx. quinquefasciatus* para uma área de 2.520 m² foi 7.262±1.537. A proporção de paridas, a duração do ciclo gonotrófico e a taxa de sobrevivência foram, respectivamente, igual a 0,48, 4,75 (CL 95% = 4,3-5,2) e 0,86, estimados para a população de *Cx. quinquefasciatus*.

Conclusões – Cães e galinhas foram hospedeiros importantes para *Cx. quinquefasciatus*, enquanto que cães foram hospedeiros importantes para *Cx. nigripalpus*. O repasto sangüíneo é mais bem detectado pelo ELISA indireto em fêmeas no estágio de Sella 2. A sobrevivência e a densidade de *Cx. quinquefasciatus* indicam que essa espécie é epidemiologicamente relevante na área do PET como espécies vetora ou peste urbana. Essa espécie deve ser objetivo do programa de controle de vetores no município de São Paulo.

Palavras-chave: Neotropical, Culex, ELISA indireto, Ecologia, Hábito alimentar, Capacidade vetora, Saúde Pública.

ABSTRACT

Introduction - *Culex quinquefasciatus* has high synanthropy, infest human dwellings and is vector of nematoids and arbovirus from endemic areas, respectively, in Brazilian coast and in Central or North America. *Culex nigripalpus* has average synanthropy and can disperse through the anthropic environment carrying Saint Louis Virus and Equine Encephalitis Virus, respectively, in North America and Venezuela. **Objective** - To characterize host-feeding habit of *Culex nigripalpus* and density, survival and host-feeding habit of *Culex quinquefasciatus* in the Parque Ecológico do Tietê (PET), São Paulo. **Methods** - The PET is an Area of Environmental Protection with resident or migratory animals. The samples of adult mosquitoes were collected, monthly, in four areas in the PET, during one year and by means of a backpack battery aspirator. An indirect ELISA technique was used for the identification of the host that is an alimentary source for the mosquito species. The density of *Cx. quinquefasciatus* population was estimated using the Mark, Release and Recapture method on the vegetation of the edge of a canal in the PET. Samples of females of *Cx. quinquefasciatus* from this place were dissected or followed in laboratory for estimating the survival rate. **Results** – *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* fed on human 6.5 and 8.3%, dog 18.8 and 27.7%, chicken 7.4 and 2.3%, rat 2.8 and 9.0%, multiple hosts 3.2 and 8.2% and unidentified hosts 67.9 and 60.9%, respectively. The unweighted human blood index (HBI) values were 0.20 for *Cx. quinquefasciatus* and 0.17 for *Cx. nigripalpus* populations. The feeding index values between the hosts human/dog, human/chicken and human/rat were, respectively, 0.35, 0.63 and 2.65 for *Cx. quinquefasciatus* and 0.30, 2.56 and 1.05 for *Cx. nigripalpus*. The distributions of blood-meals had statistically significant association on Sella 2 stage of the *Cx. nigripalpus* collected in all areas at the PET. The density of *Cx. quinquefasciatus* for an area of 2,520 m² was 7,262±1,537. The proportion of parous, gonotrophic cycle length and survival rate were, respectively, equal to 0.48, 4.75 (CL 95% = 4.3-5.2) and

0.86, for *Cx. quinquefasciatus* population. **Conclusions** – Dogs and chickens are important hosts for *Cx. quinquefasciatus*, whereas dog is an important host for *Cx. nigripalpus*. The host-blood of females in Sella 2 stage increases sensibility of the indirect ELISA assay. The survivorship and the density of *Cx. quinquefasciatus* indicate that these species are epidemiologically relevant in the PET area as either a pest or vector species. Those species should be a goal of the vector control program of Sao Paulo municipality.

Key-words: Neotropics, Culex, indirect ELISA, Ecology, Host-feeding habit, Vectorial capacity, Public Health.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 <i>CULEX (CULEX) QUINQUEFASCIATUS</i> SAY, 1823 | 15 |
| 1.2 <i>CULEX (CULEX) NIGRIPALPUS</i> THEOBALD, 1901 | 18 |
| 1.3 HÁBITO ALIMENTAR | 20 |
| 1.4 PARIDADE | 23 |
| 1.5 MARCAÇÃO, SOLTURA E RECAPTURA | 24 |
| 1.6 ESTUDOS NO PARQUE ECOLÓGICO DO TIETÊ | 26 |
| 1.7 JUSTIFICATIVA | 28 |
| 2 OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 GERAL | 29 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 29 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 3.1 PARQUE ECOLÓGICO DO TIETÊ | 30 |
| 3.2 ÁREAS DE COLETA | 31 |
| 3.3 COLETA DE CULICÍDEOS ADULTOS | 32 |
| 3.3.1 Para o estudo do hábito alimentar | 32 |
| 3.3.2 Para o estudo de paridade | 33 |
| 3.4 HÁBITO ALIMENTAR | 33 |
| 3.4.1 Padronização | 33 |
| 3.4.2 Trituração | 34 |
| 3.4.3 Sensibilização | 35 |
| 3.4.4 Bloqueio | 35 |
| 3.4.5 Amostras, controles positivo e negativo | 35 |
| 3.4.6 Peroxidase | 36 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.7 ABTS® | 36 |
| 3.4.8 Leitura | 36 |
| 3.4.9 Análise estatística | 37 |
| 3.5 SOBREVIVÊNCIA | 37 |
| 3.5.1 Paridade | 38 |
| 3.5.2 Duração do ciclo gonotrófico | 39 |
| 3.6 DENSIDADE | 40 |
| 3.6.1 Teste do aspirador | 41 |
| 3.6.2 Teste preliminar de sobrevivência | 41 |
| 3.6.3 Marcação, soltura e recaptura – protocolo 1 | 42 |
| 3.6.4 Marcação, soltura e recaptura – protocolo 2 | 42 |
| 3.6.5 Marcação, soltura e recaptura – protocolo 3 | 43 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 4.1 MANUSCRITO 1 | 44 |
| 4.2 MANUSCRITO 2 | 71 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 96 |
| 6 REFERÊNCIAS | 97 |
| ANEXO | 108 |
| Anexo 1 – Imagens dos ovários de <i>Cx. quinquefasciatus</i> | 108 |
| Anexo 2 – Local de estudo - Parque Ecológico do Tietê | 110 |
| Anexo 3 – Áreas de coleta | 112 |
| Anexo 4 – Experimentos | 114 |

SIGLAS UTILIZADAS

ABTS – Azino Benzthiazoline Sulphonate

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

CRAS - Centro de Recepção de Animais Silvestres

DAEE - Departamento de Água e Energia Elétrica

DO – Densidade Óptica

ELISA – Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

FSP - Faculdade de Saúde Pública

GPS – Global Positioning System

IgG – Imunoglobulina G

INFRAERO - Empresa Brasileira de Infraestrutura Aeroportuária

MSR – Marcação-Soltura-Recaptura

PBS - Phosphate-buffered Saline

PBS-T - Phosphate-buffered Saline Tween[®]

PET - Parque Ecológico do Tietê

pH - Potencial Hidrogeniônico

PVC – Poli Cloreto de Vinila

rpm – rotações por minuto

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias

UNT - Unidade de Turbidez Nefelométrica

USP – Universidade de São Paulo

UTM – Universal Transversa de Mercator

µL - microlitro

1 INTRODUÇÃO

1.1 *CULEX (CULEX) QUINQUEFASCIATUS* SAY, 1823

De acordo com FORATTINI (2002), *Culex quinquefasciatus* pertence ao Complexo Pipiens e, a forma adulta, possui escudo com tegumento marrom recoberto com escamas amarelo-douradas, tarsos escuros, palpos com escamas brancas no ápice, tergito com segmentos abdominais contendo manchas brancas basais, esternito recoberto por escamas brancas e occipício recoberto por escamas forquilhadas brancas em posição ântero-lateral, pretas nas laterais e posteriores.

O *Cx. quinquefasciatus* é considerado cosmopolita e distribui-se pelas regiões tropicais e subtropicais. Nas Américas, estende-se desde as regiões Central e Sul dos E.U.A. até a Argentina. O mosquito encontra-se adaptado ao meio urbano, no qual se beneficia dos processos de industrialização e urbanização, de tal forma que, em todas as fases de sua vida, mantém-se relacionado com o homem (FORATTINI, 2002). Estudos sobre o *Cx. quinquefasciatus* inferiram que essa espécie apresenta índices elevados de domiciliação (FORATTINI e col., 1973; NATAL e col., 1991) e de sinantropia (FORATTINI e col., 1993; NATAL e col., 1995; FORATTINI e col., 2000; TAIPE-LAGOS, 2000). A população de *Cx. quinquefasciatus* que prolifera no rio Pinheiros em São Paulo, tem resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos, resultando em alta densidade do mosquito e, conseqüentemente, incômodo à população humana que mora nas proximidades daquele rio (BRACCO e col., 1997). Atualmente, essa espécie se desenvolve de forma explosiva e com sobreposição de gerações naquele rio (MORAIS e col., 2006).

As formas imaturas (pupa e larvas em estádios de I a IV) dessa espécie proliferam em diversos criadouros, principalmente, em valas, córregos, canais e rios com água poluída que apresentam alto grau de eutrofização. Nessas coleções hídricas, a ausência de oxigênio dissolvido na água altera drasticamente a sobrevivência de predadores naturais e a alta concentração de matéria orgânica possibilita oferta de alimento para as formas imaturas. O desenvolvimento descontrolado e em grande número dos imaturos provoca aumento na densidade de formas adultas que causam incômodo às pessoas pela atividade hematofágica noturna dessa espécie. MARQUETTI e col. (1986), em estudo sobre a atividade hematofágica em Cuba, indicaram que a alimentação do *Cx. quinquefasciatus* ocorre, preferencialmente, no intradomicílio com picos de atividade entre 22h-23h e 01h-02h, principalmente, nas épocas chuvosas.

Diversos estudos sobre o hábito alimentar do *Cx. quinquefasciatus* foram realizados. Em FORATTINI e col. (1987), as fontes alimentares detectadas para essa espécie no Vale do Ribeira, São Paulo, indicaram antropofilia em 65% dos repastos, ornitofilia em 25% e caninofilia em 10%. Em NIEBYLSKI e MEEK (1992), o hábito alimentar dessa espécie variou em porcentagem para cães, humanos e aves nas três áreas de coleta em Louisiana, E.U.A. e, essa variação, foi decorrente da frequência ou ausência dessas fontes alimentares em cada local de coleta. DIXIT e col. (2001) indicaram que o hábito alimentar dessa espécie é antropofílico e, na ausência do homem, zoofílico em Raipur, Índia. GOMES e col. (2003) mostraram que a espécie se alimentou, habitualmente, do homem em vez de galinha, bovino ou cavalo, porém houve independência no comportamento seletivo dos mosquitos quanto as fontes alimentares disponíveis quando essas eram cães e homem, no Vale do Paraíba, São Paulo. ZINSER e col. (2004) detectaram para essa espécie 50% dos repastos em humanos, 30 % em aves, 15% em cães e 5% em gatos no Arizona, E.U.A.

CHARLWOOD (1979) desenvolveu estudo sobre a biologia e hábitos alimentares de *Cx. quinquefasciatus* em Manaus, Amazonas. Para essa região, a proporção de fêmeas oníparas foi de 34% e, para esse grupo, a estimativa da sobrevivência diária foi de 76%, segundo um ciclo gonotrófico de 4 dias estimado em experimento de laboratório. E, das 274 fêmeas ingurgitadas, 79% se alimentaram de humanos, 16% em galiformes e 5% em pássaros, mamíferos ou cães. OLEJNICEK e GELBIC (2000) observaram, em laboratório, autogenia em colônia de *Cx. quinquefasciatus* originada em Hyderabad, Índia. Nesse estudo, amostras de fêmeas sem alimentação sangüínea realizaram o primeiro ciclo gonotrófico e amostras de fêmeas sem alimentações sangüíneas e virgens não ovipuseram, mas continham folículos desenvolvidos em estágio V de CHRISTOPHERS (1911).

REISEN e col. (1991) estudaram a dispersão, o tamanho e a dispersão da população de *Cx. quinquefasciatus* na Califórnia, E.U.A. Nesse estudo, a dispersão foi associada à procura de hospedeiros e variou entre 0,6 a 1,0 Km/d. A sobrevivência diária variou de 65% a 84% e o tamanho da população variou de 36.612 a 671.634 fêmeas por Km². REISEN e col. (1992) estudaram a dispersão e a sobrevivência da população dessa espécie na Califórnia, E.U.A. Nesse estudo, as fêmeas marcadas foram recapturadas, principalmente, nas áreas residenciais a 1 km do ponto de soltura e a sobrevivência diária variou de 74% a 84%. GARCÍA-REJÓN e col. (2005) e ELIZONDO-QUIROGA e col. (2006) estimaram em amostras de campo a duração do ciclo gonotrófico e a sobrevivência diária da população de *Cx. quinquefasciatus* no México, respectivamente, em 4 dias e entre 78% e 91% e em 2-3 dias e entre 87% e 88%.

Apesar de o *Cx. quinquefasciatus* não participar da transmissão de agentes infecciosos na cidade de São Paulo, esse inseto foi incriminado vetor de múltiplos agentes em outras regiões. MEDEIROS e col. (1992), nas cidades de Recife-PE, Olinda-PE e Jaboatão-PE, e CALHEIROS (1996), em Maceió-AL, detectaram a ocorrência de larvas L₃ de *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática, em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*. WHITE (1989) destacou o *Cx. quinquefasciatus* como vetor primário daquele verme em regiões da Ásia, África, América do Sul e do Pacífico. Essa espécie apresenta competência vetora para a transmissão de agentes infecciosos, a saber: vírus Oropouche em humanos (CONSOLI e LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994); verme nematóide *Dirofilaria immitis* (AHID e col., 2000); arbovírus da encefalite de São Luís (FORATTINI, 2002) e vírus do Nilo Ocidental (VNO) (SARDELIS e col., 2001; GODDARD e col., 2002). VYTHILINGAM e col. (1997) detectaram infecção natural pelo vírus da Encefalite Japonesa em mosquitos dessa espécie em Sepang, Malásia. A introdução dos agentes supracitados na cidade de São Paulo, que apresenta fluxo contínuo e intenso de pessoas por dia, é possível e poderia culminar em novos casos dessas doenças devido à competência vetora e à densidade das formas adultas do *Cx. quinquefasciatus*.

1.2 *CULEX (CULEX) NIGRIPALPUS* THEOBALD, 1901

Culex nigripalpus distribui-se desde o Trópico de Câncer, na América do Norte, até o Trópico de Capricórnio, na América do Sul. Esse mosquito é muito eclético no que concerne à escolha do habitat para o desenvolvimento das formas imaturas. Essa espécie é abundante em matas residuais e em áreas abertas e possui a capacidade de adaptação a ambientes alterados pelo homem (FORATTINI, 2002).

As formas imaturas se desenvolvem em criadouros naturais no solo permanentes de água limpa e se alimentam da matéria orgânica particulada. FORATTINI e col. (1994), em estudo ecológico de formas imaturas de diferentes espécies de mosquitos em campo de plantação de arroz no Vale do Ribeira, destacaram a adaptação do *Cx. nigripalpus* nesse ambiente antrópico. As formas adultas ocorrem em ambientes de mata úmida, densa e escura no período diurno e possuem atividade hematofágica noturna quando se dispersam em busca de fontes sangüíneas. No Parque Estadual da Serra do Mar, localizado nas proximidades da cidade de São Paulo, GUIMARÃES e col. (2000) identificaram 286 adultos de *Cx. nigripalpus* de 20.591 indivíduos coletados.

Estudo sobre o hábito alimentar do *Cx. nigripalpus*, realizado por GOMES e col. (2003) no Vale do Paraíba, indica o comportamento oportunista dessa espécie em consideração à fonte alimentar disponível. Nesse estudo, a amostra de mosquitos dessa espécie fez 45% dos repastos em galinha, 22% em bovino, 18% em humano, 11% em cães, 1,5% em cavalo, 1,5% em rato, 0,5% em gato e 0,5% em porco. EDMAN e col. (1974), em estudo sobre o efeito defensivo do hospedeiro no ato hematofágico do *Cx. nigripalpus*, evidenciaram que o comportamento defensivo do hospedeiro influencia na freqüência de repastos realizados. ANDERSON e col. (1995) detectaram repasto sangüíneo em múltiplos hospedeiros em 5,5% da amostra de mosquitos dessa espécie na Flórida, E.U.A.

De acordo com FORATTINI (2002), nas áreas tropicais, o *Cx. nigripalpus* é considerado vetor de múltiplos arbovírus. MENDEZ e col. (2001), em estudo que analisou a dispersão de mosquitos em foco silvestre e do vírus da encefalite eqüina venezuelana (EEV), mostraram que o *Cx. nigripalpus* pode exportar o vírus do foco silvestre para ambientes onde o ser humano habita. Em FORATTINI e col. (1995), o estudo de comportamento do mosquito adulto em ambiente antrópico, no Vale do Ribeira, indicou que o *Cx. nigripalpus* tem tendência para ocupar o ambiente antrópico, apesar da baixa sinantropia. Nesse estudo, portanto, o *Cx. nigripalpus* foi apontado como vetor potencial do arbovírus da encefalite de São Luís (ESL).

SARDELIS e col. (2001), em estudo de competência vetora de mosquitos *Culex* norte americanos para o VNO, consideraram que o *Cx. nigripalpus* é vetor competente do VNO em laboratório e mostra hábitos ornitofílico e antropofílico podendo, portanto, participar da transmissão do vírus tanto no ambiente silvestre como no urbano.

1.3 HÁBITO ALIMENTAR

A caracterização dos hábitos alimentares das fêmeas de mosquitos (Diptera, Culicidae) informa a variedade de animais em que as mesmas podem se alimentar. As fêmeas de culicídeos possuem hábito alimentar distinto dos machos. Os machos alimentam-se de seiva vegetal e as fêmeas, fitófagas facultativas, são hematófagas. O sangue permanece no estômago do mosquito até a digestão. Patógenos que estiverem no sangue ingerido poderão infectar os órgãos e as glândulas salivares das fêmeas. O sangue ingerido pelas fêmeas será importante para o desenvolvimento e maturação dos ovos. Sabe-se que pode existir sincronia entre a alimentação e a oviposição, ou seja, a cada alimentação ocorre uma oviposição. No entanto, essa sincronia pode não ocorrer e, nesse caso, as fêmeas necessitam de mais de uma alimentação para que ocorra a oviposição. No caso da fêmea realizar um segundo repasto, os patógenos presentes nas glândulas salivares ou no aparelho bucal poderiam infectar novo hospedeiro suscetível. Essas informações podem sugerir a participação dessas espécies no ciclo de transmissão de agentes infecciosos.

As reações de precipitação são utilizadas para a detecção de anticorpos ou antígenos solúveis. Os antígenos são capazes de se ligar em vários anticorpos ao mesmo tempo e, conseqüentemente, ocorre a formação de imunocomplexos. A formação de imunocomplexos pode ser indicativa da presença de antígenos ou anticorpos sob investigação. Ressaltam-se três metodologias utilizadas para a aplicação do teste de precipitina: teste do anel (Ascoli apud SANTOS, 1990, p.7), o mais comum deles; teste do capilar ou micro-hematócrito (SCHUBERT e HOLDEMAN, 1956; TEMPELIS e LOFY, 1963), o mais utilizado e teste em ágar-gel, desenvolvido para reduzir em quantidade os reagentes empregados. FORATTINI e col. (1987), NIEBYLSKI e MEEK (1992), FLORES-MENDONZA e col. (1996) e GOMES e col. (2003) estudaram o hábito alimentar de mosquitos Culicidae, respectivamente, no Vale do Ribeira-SP, em Louisiana (E.U.A.), no Guapimirim-RJ e no Vale do Paraíba-SP com a utilização do teste de precipitina em tubo capilar. DIXIT e col. (2000) e SAMUEL e col. (2004) identificaram o hábito alimentar de *Cx. quinquefasciatus* com a utilização do teste de precipitina em ágar-gel na Índia.

SANTOS (1990), em estudo sobre o sobre as técnicas de determinação do hábito alimentar de artrópodes vetores, destacou o teste de precipitina e o método imunoenzimático de ELISA. SANTOS (1990), comparando o teste de precipitina e o método de ELISA, conclui: o teste de precipitina apresenta baixo custo para ser implantado; requer equipamento mínimo e pequenas quantidades de reagente; possui fácil execução e interpretação; apresenta boa reprodutibilidade em laboratório ou em campo; tem diagnóstico rápido; apresenta boa sensibilidade e especificidade. O método de ELISA apresenta alto custo para ser implantado; requer equipamentos sofisticados e reagentes caros; pode ser quantificado, automatizado e a preparação dos anti-soros não requer técnicas especiais; permite boa reprodutibilidade no laboratório e no campo; têm diagnóstico rápido; apresenta maior sensibilidade; necessita de pequena porção de repasto sangüíneo e permite o reconhecimento de repastos sangüíneos em múltiplos hospedeiros.

BURKOT e col. (1981) introduziram o método imunoenzimático de ELISA indireto como alternativa para a detecção da fonte alimentar de insetos hematófagos. BEIER e col. (1988) utilizaram o método de ELISA direto no qual se utiliza anticorpos conjugados com enzimas que detectam antígenos do hospedeiro adsorvidos à placa de teste. A quantidade de ligações entre anticorpo-antígeno pode ser visualizada adicionando substratos para as enzimas. SERVICE e col. (1986) divulgaram o método de ELISA sandwich que tem alta sensibilidade e especificidade e é utilizado quando as amostras contêm pouca quantidade de antígeno. Nesse método, anticorpos são adsorvidos à placa de teste e se ligam aos antígenos homólogos do hospedeiro os quais são detectados por anticorpos específicos conjugados com enzimas. CHOW e col. (1993) realizaram estudo em que três protocolos de ELISA foram comparados segundo a sensibilidade e a especificidade. O protocolo com o ELISA sandwich-B teve a maior sensibilidade na detecção dos sangue dos hospedeiros.

No ELISA indireto, o sangue contido no estômago de fêmeas ingurgitadas contém anticorpos específicos produzidos pelo sistema imunológico do animal picado pelo mosquito. No método, os anticorpos ligam-se aos antígenos adsorvidos à placa do teste e, após essa fase, anti-imunoglobulinas marcadas com enzima ligam-se aos anticorpos específicos. A reação da enzima degrada o substrato e realça cor que indica reação positiva. Por exemplo, reação positiva para sangue de galinha representa presença de anticorpos específicos de galinha no sangue contido no abdome do mosquito.

1.4 PARIDADE

A determinação da paridade em amostras de fêmeas de mosquitos (Diptera, Culicidae) permite estimar a taxa de sobrevivência diária e, assim, inferir esse parâmetro para a parcela da população com capacidade de transmitir agentes infecciosos. Os ciclos de oviposições das fêmeas anautógenas e com concordância gonotrófica encerram etapas como cópula, repasto sangüíneo, gravidez e oviposição. Após completo o primeiro, poderá ser iniciado o segundo ciclo. As fêmeas autógenas podem completar o primeiro ciclo de oviposição sem realizar repasto sangüíneo. Fêmeas que apresentam discordância gonotrófica fazem um ou mais repastos sangüíneos por ciclo de oviposição. Para qualquer um dos casos, ocorrerá modificações irreversíveis nos órgãos reprodutivos das fêmeas ao final do primeiro ciclo de oviposição.

O sistema reprodutivo das fêmeas consiste de dois ovários e ductos associados, localizados entre os 4º e 5º segmentos abdominais (ANEXO 1-FIGURA 1). Durante a maturação dos folículos, há o crescimento dos mesmos, ocupando toda a cavidade abdominal do 1º ao 7º segmento (ANEXO 1-FIGURA 2). As ramificações traqueolares são distendidas após a maturação dos folículos devido ao acúmulo de vitelo e, conseqüente, aumento de tamanho desses. Após a oviposição, as ramificações traqueolares estão distendidas (ANEXO 1-FIGURA 3).

Segundo o método de DETINOVA (1949), a observação das traquéolas presentes nos dois ovários permite distinguir a fêmea nulípara daquela onípara. Fêmeas nulíparas têm ramificações traqueolares enoveladas, pois nunca realizaram oviposição e as oníparas têm ramificações traqueolares distendidas, pois realizaram pelo menos uma oviposição. As traquéolas são ramificações do sistema traqueal que transportam oxigênio às células dos ovários e de outros órgãos internos.

O método divulgado por POLOVODOVA (1949) preconiza a observação das dilatações nos ovaríolos. Cada ovário é formado por 50 a 100 ovaríolos. O ovaríolo é formado pelo germário, pelo folículo e pelo pedicelo folicular. O germário produz o folículo que se desenvolve e deixa no pedicelo uma dilatação. Cada dilatação representa a realização de um ciclo de oviposição (ANEXO 1-FIGURA 4). Esses critérios são da Escola Clássica e estão descritos, detalhadamente, em CHARLWOOD e col. (1980) que fazem uma revisão dos métodos para a determinação da idade fisiológica com especial referência aos vetores biológicos na América do Sul. VYTHILINGAM e col. (1997) e KAKITANI e FORATTINI (2000) estudaram a paridade de culicídeos de importância médica por meio dos métodos da Escola Clássica, devido, provavelmente, à praticidade em aplicar os mesmos a fim de determinar a paridade de amostras de mosquitos.

A Escola Nova, representada pelos estudos de SOKOLOVA (1994) e FOX e BRUST (1994), admite que o grau de paridade deva ser estimado pela presença de saco folicular e não de dilatações. O saco folicular é formado no pedicelo após a passagem do folículo. A dilatação é de natureza abortiva, ou seja, resultante de oogênese anormal (ANEXO 1-FIGURA 5).

1.5 MARCAÇÃO, SOLTURA E RECAPTURA

Esse método é utilizado com a finalidade de obter informações que permitam a estimativa da densidade, da sobrevivência e da dispersão de populações de animais. Em epidemiologia, essa metodologia tem sido aplicada a populações de vetores biológicos de agentes infecciosos como subsídio para a avaliação da capacidade vetora (FORATTINI e SANTOS 1999) e para estimar o raio de vôo das populações de vetores.

REISEN e col. (1991) realizaram estudos de marcação, soltura e recaptura com mosquitos *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis* e *Cx. stigmatosoma* na Califórnia. Nesse estudo, larvas coletadas nos criadouros foram criadas até a fase adulta em laboratório. Adultos com menos de 24h de vida foram marcados com pó fluorescente e soltos uma hora depois do entardecer. Coletas com armadilhas de CO₂ foram realizadas para acrescentar na amostra mosquitos que seriam marcados e soltos. As recapturas aconteceram a partir da primeira noite de soltura e nos 10 dias subsequentes por meio de 40 armadilhas de CO₂, 12 armadilhas CDC para fêmeas grávidas e 8 aspiradores mecânicos. Os mosquitos foram anestesiados e examinados sob microscópio óptico com luz ultravioleta. Todas as fêmeas marcadas foram dissecadas para determinar a paridade. As taxas de recaptura (%) para cinco locais foram 0,8 – 3,1 – 11,3 – 0,9 – 14,6.

REISEN e col. (1991) conseguiram estimar a duração do ciclo gonotrófico, a sobrevivência diária, o tamanho da população e a dispersão da população de *Cx. quinquefasciatus*. A duração do ciclo gonotrófico foi considerada como sendo o número de dias entre o pico de nulíparas e paridas recapturadas, admitindo o dia da soltura como d=0. A sobrevivência diária foi considerada igual à raiz genésima, equivalente a duração do ciclo gonotrófico, da taxa de oniparidade. O tamanho da população foi estimado usando modificações no Índice de Lincoln propostas por BAILEY (1952).

LINIQUIST e col. (1967), MACDONALD e col. (1968), RAJAGOPALAN e col. (1973) e SCHREIBER e col. (1988) realizaram estudos de marcação, soltura e recaptura em *Cx. quinquefasciatus*. As maiores distâncias alcançadas foram, respectivamente, 915 m – 200 m – 105 m – 1,27 km.

1.6 ESTUDOS NO PARQUE ECOLÓGICO DO TIETÊ

Diversos autores têm realizado estudos na fauna de culicídeos da área preservada e da área localizada próxima à área urbana do PET. Devido à proximidade ao meio urbano e à complexidade natural do PET, os estudos em entomofauna objetivam compreender a ecologia, fisiologia e epidemiologia das populações de culicídeos.

SOUBIHE (1994) iniciou os estudos ecológicos em populações de culicídeos no PET e encontrou freqüências nas amostras coletadas de *Culex (culex) sp* em 40%, *Mansonia titillans* em 30%, *Aedes scapularis* em 8%, *Culex ribeirenses* em 5%, *Culex declarator* em 5%, *Culex quinquefasciatus* em 3%, *Mansonia indubitans* em 3% e outros culicídeos em 6% na área interna do PET.

TAIPE-LAGOS (2000) estudou a ecologia de culicídeos do local e as espécies *Ae. scapularis*, *Cx. quinquefasciatus* e *Culex declarator*, foram as mais freqüentes, abundantes e dominantes. Nesse estudo, as espécies *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. scapularis* foram predominantes, respectivamente, em 54,6% e 34,7% das amostras de mosquitos coletados no ambiente peridomiciliar. E, discutiu-se o potencial epidemiológico de *Aedes scapularis*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex declarator*, *Aedes albopictus*, *Psorophora ferox* e *Culex nigripalpus* no local.

URBINATTI (2000) estudou o comportamento físico-químico dos criadouros associados à ecologia das formas imaturas de culicídeos em três lagos na área interna e em um canal de circunvalação poluído na periferia do PET. Nesse estudo, os criadouros na área interna mostraram fauna diversa de culicídeos nos gêneros *Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia* e *Uranotaenia* e de predadores em 10 táxons. Entretanto, o canal de circunvalação continha uma única espécie, o *Cx. quinquefasciatus*, que possui adaptação em coleções hídricas altamente eutrofizadas e sobrevive, enquanto que outras formas imaturas de culicídeos e de fauna associada não suportam alta concentração de matéria orgânica.

Cx. quinquefasciatus possui tamanho maior e menor proporção de fêmeas paridas que *Ochlerotatus scapularis* em diversos habitats do PET e as espécies apresentam discordância gonotrófica (MENEZES, 2002).

A população de *Cx. quinquefasciatus* em abrigos na margem do canal de circunvalação poluído pareceu não sofrer a influência da precipitação e nem da temperatura ao longo de ano, entretanto, a retirada da vegetação marginal que abriga os adultos influenciou na dispersão dos mesmos para outras áreas do canal (LAPORTA e col., 2006).

O Parque Ecológico do Tietê possui espécies silvestres de mamíferos e aves que podem estar em vida livre na área restrita à visitação ou em cativeiro no CRAS. São 21 espécies de mamíferos (*Leopardus tigrinus*, *Cerdocyon thous*, *Tayassu pecari*, *Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata*, *Procyon cancrivorus*, *Euphractus sexcinctus*, *Tapirus terrestris*, *Cebus paella*, *Hydrochaeris hydrochaeris*, *Sphigurus spinosus*, *Dasyprocta agouti*, *Nasua nasua*, *Galitica cuja*, *Myocastor coypus*, *Alouata fusca*, *Lontra longicaudis*, *Didelphis aurita*, *Tayassu tajacu*, *Mazama gouazoubira* e *Dasypus novencinctus*) e 35 famílias de aves em vida livre (Emberezinae, Podicipedidae, Phalacrocoracidae, Anhingidae, Ardeidae, Anatidae, Cathartidae, Accipitridae, Falconidae, Aramidae, Rallidae, Jacanidae, Charadriidae, Scolapacidae, Recurvirostridae, Columbidae, Psittacidae, Cuculidae, Nyctibiidae, Caprimulgidae, Apodidae, Trochilidae, Alcedinidae, Picidae, Furnaridae, Corvidae, Tyrannidae, Hirundinidae, Troglodytidae, Mimidae, Turdidae, Vireonidae, Icterinae, Coerebinae, Thraupinae e Emberezinae).

PEREIRA e col. (2001) isolaram o arbovírus Ilhéus de aves silvestres que têm comportamento migratório. Essa descoberta indica que pode haver introdução de outros arbovírus no PET, pois o local é ponto de destino de aves migratórias e de animais apreendidos procedentes de diversas regiões do país.

1.7 JUSTIFICATIVA

Populações de *Cx. quinquefasciatus* são altamente sinantrópicas e antropofílicas, causando muito incômodo às pessoas em áreas urbanizadas. Na cidade de São Paulo, salienta-se que moradias nas margens do rio Negrinho, no PET, sofrem com a intensa infestação e a constante atividade hematofágica dessa espécie. A população de *Cx. nigripalpus* se concentra em áreas de paisagem silvestre na área interna do PET e pode se dispersar em busca de fonte alimentar no período noturno. Esse comportamento indica que essa espécie pode ser um vetor-ponte, podendo carregar arbovírus silvestres e transmiti-los para humanos em áreas periféricas do PET.

A investigação do hábito alimentar de *Culex quinquefasciatus* e de *Culex nigripalpus* informa sobre o comportamento alimentar das fêmeas e permite discutir o potencial epidemiológico dessas espécies nessa área de paisagem silvestre com variedade de fontes alimentares. Algumas dessas fontes são provenientes de outras regiões as quais podem ser endêmicas para patógenos transmitidos por mosquitos. Para o estudo do hábito alimentar, foi aplicado o ELISA indireto que será padronizado pela primeira vez para essas espécies. Os resultados dessa pesquisa poderão subsidiar estudos futuros sobre o hábito alimentar de espécies de *Culex* no Brasil ou em outro país.

A metodologia aplicada nessa pesquisa para a estimativa da taxa de sobrevivência diária e da densidade populacional do *Culex quinquefasciatus* para discutir aspectos da capacidade vetora dessa população é inédito no Brasil e muito importante para a vigilância epidemiológica de vetores biológicos. Pretende-se viabilizar essa metodologia que encerra diversas etapas de campo, laboratório, análise estatística e matemática a fim de disponibilizá-la ao CCZ da prefeitura de São Paulo que, atualmente, controla a população de *Cx quinquefasciatus* no rio Pinheiros e que pretende atuar na população dessa espécie no rio Negrinho.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar alguns parâmetros da capacidade vetora da população adulta do mosquito *Culex quinquefasciatus* e o hábito alimentar das espécies *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*, no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo.

2.2 ESPECÍFICOS

- Estimar a paridade da população de fêmeas do mosquito *Cx. quinquefasciatus* no PET.
- Estimar a duração do ciclo gonotrófico da população de fêmeas do mosquito *Cx. quinquefasciatus* no PET.
- Estimar a sobrevivência diária da população de fêmeas do mosquito *Cx. quinquefasciatus* no PET.
- Estimar a densidade da população de fêmeas do mosquito *Cx. quinquefasciatus* no PET.
- Conhecer os hábitos alimentares das populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* no PET.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PARQUE ECOLÓGICO DO TIETÊ

São Paulo é metrópole de 11 milhões de habitantes distribuídos em área de 900 km² (ANEXO 2 – FIGURAS 1 e 2). O crescimento populacional e a ocupação excessiva nas margens do rio Tietê provocaram quadro alarmante de enchentes. É dentro dessa perspectiva que surge a necessidade de implantar projetos de intervenção urbana e conservação. O PET (ANEXO 2 – FIGURA 3) foi implantado de acordo com o Decreto 7.868 de 30/04/1976, que determinou de utilidade pública a área total de 140 km². Essa área contém 800 metros de largura média que acompanha o rio Tietê ao longo de 148 quilômetros.

O Parque, que visa preservar a planície de inundação do rio Tietê e oferecer espaços de lazer à população, é administrado pelo DAEE do Estado de São Paulo e foi estabelecido como Área de Proteção Ambiental com a Lei 5.598 de 06 / 02 / 1987. O Parque ocupa área verde implantada em meio urbano que separa o leito do rio Tietê e a rodovia Ayrton Senna, na divisa dos municípios de São Paulo - zona leste e de Guarulhos. O local comporta área reflorestada com espécies nativas de mata Atlântica, viveiro de mudas, animais vertebrados residentes ou migradores, centro de recepção de animais silvestres, complexo de águas continentais formado por canais de circunvalação, lagoas, lagos e pelo rio Tietê, além de equipamentos de lazer social (ECOTIETÊ 2007).

A temperatura média e a precipitação total de setembro de 2003 a agosto de 2004 foram, respectivamente, 18,9 °C e 1150,0 mm, segundo informações da estação meteorológica da INFRAERO no Aeroporto Internacional de Guarulhos.

3.2 ÁREAS DE COLETA

As áreas de coleta 1, 2, 3 e 4, em 726 metros de altitude, foram escolhidas no centro de lazer Engenheiro Goulart, com referência aos estudos anteriores que indicaram a presença e freqüência das espécies (TAIPE-LAGOS, 2000; URBINATTI, 2001; LAPORTA e col., 2006) .

Localiza-se a área 1 pelas coordenadas geodésicas (IBGE, 1999), 23K 344659 Oeste (O) e 7401442 Sul (S). Nesse local, há um lago e a vegetação apresenta espécies nativas de mata Atlântica e predomínio de eucaliptos (ANEXO 3 – FIGURA 1).

A área 2 (ANEXO 3 – FIGURA 2), nas coordenadas geodésicas 23K 344670 (O) e 7401215 (S), contém vegetação secundária de mata Atlântica e está próxima ao CRAS onde os veterinários oferecem cuidados aos animais que chegam ao PET. Esses animais são mantidos em cativeiro.

A área 3, coordenadas geodésicas 23K 344771 (O) e 7401215 (S) é aberta e próxima da Administração do PET (ANEXO 3 – FIGURA 3).

A área 4, coordenadas 23K 0343041 (O) e 7400206 (S) contém um canal de circunvalação, denominado rio Negrinho, construído na divisa do PET com a finalidade de captar águas pluviais. Na margem direita desse canal, ocorre vegetação arbustiva que representa abrigo para a população de mosquitos. Na margem esquerda habitam nove mil moradores do bairro Jd. São Francisco, uma área do invadida do parque. Tanto as habitações do bairro como as condições de saneamento e saúde são precárias ou inexistentes, principalmente, no local do córrego poluído onde se deposita o esgoto clandestino e parte dos resíduos sólidos dessa população (ANEXO 3 – FIGURA 4). URBINATTI (2001) identificou turbidez mensal média de 54,525 UNT e oxigênio dissolvido mensal médio de 0,175 mg/l na água que compõe esse criadouro, de fevereiro de 1997 a janeiro de 1998, caracterizando o criadouro como poluído, eutrofizado e ideal para proliferação intensa de imaturos de *Cx. quinquefasciatus*.

3.3 COLETA DE CULICÍDEOS ADULTOS

3.3.1 Para o estudo de hábito alimentar

Foram realizadas doze coletas, de junho de 2005 até maio de 2006, no período matutino, nas quatro áreas de coleta, no PET. Ambas as espécies têm picos de atividade hematofágica noturna e, naquele período, as fêmeas ingurgitadas estão nos abrigos fazendo a digestão do sangue. As coletas dos mosquitos adultos foram realizadas com auxílio de aspirador cilíndrico de PVC e metal com 1 metro de comprimento e 15 cm de diâmetro, com motor OXFORD® e ventoinha de 5 palhetas, à bateria recarregável de 12 volts, 7 ampéres e chumbo-ácida selada regulada por válvula. Essa técnica de captura permite coletar fêmeas abrigadas que fizeram repasto sangüíneo, estão digerindo o sangue e maturando os folículos. As amostras foram concluídas no intervalo de 20 minutos. Os espécimes coletados em cada área de coleta foram mortos com acetato de etila e acondicionados em recipiente com esferas de sílica. Essas esferas de sílica são altamente higroscópicas e impedem a proliferação de microrganismos no material. A seguir, foram transportados ao laboratório de Entomologia da FSP-USP.

Fêmeas ingurgitadas das espécies de interesse de cada amostra foram identificadas por meio da utilização de chaves taxonômicas de identificação de culicídeos da região Neotropical divulgadas por FORATTINI (2002). As fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em microtubos de 1,5 ml com esferas de sílica com etiqueta que identificava o mês e área de coleta, a espécie e, a partir da 7ª coleta, o estágio de SELLA (1920). O material foi levado ao Laboratório de Bioquímica/Biologia Molecular da SUCEN para a realização do ELISA indireto.

3.3.2 Para o estudo de paridade

Amostras mensais de mosquitos foram coletadas com auxílio de aspirador à bateria, durante vinte minutos, na área 4, de junho de 2005 a maio de 2006. Os espécimes coletados foram transferidos para uma gaiola tetraédrica de metal e madeira com faces teladas e outra com pano em forma de saco para a introdução dos mosquitos dentro do puçá utilizado na aspiração. Um pano umido foi colocado em cima da gaiola que foi transportada até o laboratório.

3.4 HÁBITO ALIMENTAR

O protocolo do ELISA indireto foi utilizado para a detecção da origem do sangue ingerido. O protocolo foi padronizado segundo CHOW e col. (1993) e, ainda, contém modificações.

3.4.1 Padronização

Criou-se *Culex quinquefasciatus* em laboratório os quais foram alimentados com sangue a fim de determinar as quantidades ótimas de sangue e o tempo de digestão para o teste de ELISA indireto.

Realizou-se titulação em bloco de anti-soros (anti-IgG) de cachorro, galinha, humano e rato para determinação das concentrações ótimas dos anti-soros e conjugados com peroxidase a partir do limiar de reatividade dos anti-soros pelo limiar de reatividade dos conjugados com peroxidase. Amostras de sangue homólogo e heterólogo foram utilizadas para verificação de reação cruzada. As diluições padronizadas estão na TABELA 1.

TABELA 1 – Distribuição de diluições de captura e peroxidase segundo o anti-soro IgG, São Paulo, 2006.

| Anti-soro IgG | Captura | Peroxidase |
|---------------|---------|------------|
| Cachorro | 1/4000 | 1/4000 |
| Galinha | 1/4000 | 1/6000 |
| Humano | 1/6000 | 1/6000 |
| Rato | 1/500 | 1/500 |

Fonte: SUCEN, 2006.

Não houve reação cruzada entre os anti-soros e as amostras de sangue heterólogas. Entretanto, poderia haver reações cruzadas, por exemplo, entre rato e roedores silvestres. A quantidade de sangue no abdome do mosquito necessária para a detecção do ELISA indireto foi aquela presente em uma fêmea no estádio de Sella 6, ou seja, 48 horas após a alimentação.

3.4.2 Trituração

Os mosquitos foram separados individualmente em recipientes Ependorf[®]. Adicionaram-se 150 µl de PBS 1x pH 7,0-7,4 em cada recipiente e colocaram-se esses em isopor com gelo em cima da bancada. Com auxílio de triturador Foredom[®] (110 v, 14.000 rpm), cada mosquito foi triturado e homogeneizado na solução de trituração, o PBS 1x. Nessa etapa, foi fundamental que as ponteiros do triturador fossem lavadas entre as triturações e homogeneizações. Essa solução, denominada solução MÃE, foi pipetada para os microtubos os quais foram colocados em caixas. Cada microtubo foi identificado com o nome da espécie, estádio de Sella, a área e o dia da coleta. Retirou-se 20 µl da solução MÃE (5µl-mosquito/150µL-PBS 1x) e colocou-se esse volume em microtubo com 180µl de PBS 1x. Essa solução, denominada solução de ELISA, foi usada no teste. As caixas foram colocadas em congelador a -20°C com os microtubos contendo a solução MÃE e a solução de ELISA.

3.4.3 Sensibilização

Utilizaram-se placas de microtitulação de PVC (Costar[®] 2797, Cambridge, MA, USA) e em cada poço dessas foram adicionados 50µl de anti-soro de captura na diluição previamente determinada na padronização em PBS 1x. As placas foram colocadas por uma hora em câmara úmida.

3.4.4 Bloqueio

A solução de bloqueio contém 5ml de leite desnatado Molico Nestle[®] em pó em 95mL de PBS-T. Retirou-se o antisoro de captura e acrescentaram-se 200µl de solução de bloqueio em cada poço. As placas foram colocadas por uma hora em câmara úmida.

3.4.5 Amostras, controles positivo e negativo

Após o descarte da solução de bloqueio, as soluções de ELISA, os controles positivos e negativos foram adicionados no volume de 50µl por poço. A solução de controle negativo continha 30µl de solução MÃE (1 macho/150µL de PBS 1x) e 270µl de PBS 1x. A solução de controle positivo continha 10µl de solução MÃE (5µl do sangue do animal em teste/150µl de PBS 1x) e 90µl de PBS 1x. As placas foram colocadas por duas horas em câmara úmida. Nenhuma dessas soluções foram adicionadas na coluna 8 da placa que é denominada Blank.

3.4.6 Peroxidase

Desprezaram-se as soluções e lavou-se a placa 3 vezes com solução de lavagem. A solução de lavagem continha 900ml de H₂O destilada, 100mL de PBS 10x e 500mL de Tween[®] 20. Adicionaram-se 50µl de conjugado peroxidase específico (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) em cada poço na diluição previamente estabelecida na padronização em solução de bloqueio a 2,5%. As placas foram colocadas por duas horas em câmara úmida.

3.4.7 ABTS[®]

Retirou-se a peroxidase e a placa foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem. Adicionou-se 100µl a solução de substrato de peroxidase, ABTS[®] (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA), em cada poço. As placas foram colocadas por meia hora em câmara escura.

3.4.8 Leitura

As placas foram lidas em Leitor de ELISA Organon[®] Teknica Microwell System e os resultados da leitura das densidades ópticas (DO) de cada poço foram impressos. A média das densidades ópticas da coluna Blank ficou entre 0,100 e 0,200, indicando que a diluição dos reagentes e o método foram bem padronizados.

3.4.9 Análise estatística

Os valores das DO foram números decimais e, portanto, essa variável foi considerada como quantitativa contínua e transformada em variável qualitativa. A média da DO dos controles negativos + 3 vezes o desvio padrão foi o *Cut-off* da placa. As amostras com DO acima do *Cut-off* eram positivas. Houve dois resultados possíveis, pois ou a amostra era positiva ou negativa. As freqüências dos valores foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado (X^2) segundo estágio de Sella, área e mês de coleta. A proporção de repastos sangüíneos em seres humanos em relação aos repastos em outros animais e a proporção de repastos sangüíneos em determinado animal considerando a disponibilidade desse animal na área foram calculados por meio do *Human Blood Index* e *Feeding Index*, respectivamente.

3.5 SOBREVIVÊNCIA

A sobrevivência diária da população de *Cx. quinquefasciatus* foi estimada segundo o método de DAVIDSON (1954). Na equação abaixo, a raiz genésima da proporção de fêmeas oníparas da amostra representa numericamente a sobrevivência diária para a amostra.

$$S = \sqrt[g]{\frac{\text{Fêmeas oníparas}}{\text{total}}}$$

s= sobrevivência diária; g= duração do ciclo gonotrófico.

3.5.1 Paridade

Cada fêmea foi anestesiada, individualmente, com éter etílico, colocada em uma lâmina de microscópio e identificada em um estereomicroscópio. Seus ovários foram separados do abdômen, colocados em água destilada e examinados em um microscópio óptico sob amplificação de 100x. Cada fêmea foi identificada como nulípara ou parida. Os ovários se dilatam e as ramificações traqueolares se distendem durante a maturação dos folículos em um ciclo de oviposição. Após a oviposição, as traquéolas distendidas não se enovelam, exibem morfologia distinta e irreversível. As traquéolas distendidas nos ovários indicam que a fêmea é parida, pois representam a ocorrência de desenvolvimento ovariano. As traquéolas enoveladas nos ovários indicam que a fêmea é nulípara, pois representam a ausência de desenvolvimento ovariano. As fêmeas com folículos no estágio V de CHRISTOPHERS (1911) foram consideradas paridas. Para cada coleta, foram dissecadas 100 fêmeas ou, em caso de capturas com número menor de fêmeas, dissecou-se o número total. As fêmeas foram dissecadas até dois dias após a captura para evitar viés na identificação da fase do desenvolvimento dos ovários.

O tamanho mínimo da amostra para a estimativa da proporção de fêmeas paridas na população foi de 384 fêmeas com precisão de 5% e intervalo de confiança de 95%. O modelo matemático usado no cálculo foi $n^* = P.Q / (d/1,96)^2$, no qual n^* = tamanho de amostra mínimo para permitir uma estimativa em uma dada precisão; P = valor prévio da proporção a ser estimada; Q = 1 - P; P.Q = variância prévia do parâmetro na população; d = erro padrão que representa a precisão da estimativa; 1.96 = intervalo de confiança de 95% que representa a probabilidade de conter o parâmetro real da população. A variância escolhida foi 0,25 que é o maior valor possível para a variância dessa variável.

3.5.2 Duração do ciclo gonotrófico

De acordo com URBINATTI e col. (2001), *Cx. quinquefasciatus* é a única espécie de Culicidae que ocorre no canal de circunvalação. Larvas em quarto estadio e pupas de *Cx. quinquefasciatus* foram coletadas do canal usando uma concha entomológica. O material foi transportado ao laboratório e as pupas foram separadas em quatro gaiolas que compuseram quatro coortes de *Cx. quinquefasciatus*. Cada coorte tinha machos e fêmeas e a razão sexual era 3:2 para os machos. A razão sexual foi selecionada de acordo com OLEJNICEK & GELBIC (2000) a fim assegurar a cópula que é essencial para as fêmeas oviporem ovos viáveis. As fêmeas adultas fizeram um repasto sanguíneo completo em um camundongo *Mus musculus* imobilizado em uma estrutura cônica de fios de metal entrelaçados, entre às 18h até às 8h, nas gaiolas. Um recipiente com uma solução de açúcar a 10% foi mantido dentro das gaiolas durante o experimento, exceto quando os insetos foram alimentados com sangue. As coortes de mosquitos foram acompanhadas durante um mês. Durante esse período, observou-se a presença de ovos na superfície da água. A duração do ciclo gonotrófico em dias foi o intervalo entre o repasto sanguíneo e a oviposição para cada coorte de fêmeas ingurgitadas.

Os mosquitos foram mantidos em 14 horas de luz e 10 horas de escuro. A temperatura e os dados da umidade relativa foram adquiridos usando um dispositivo que detectasse o calor e a umidade do ar dentro do laboratório. A determinação da restrição estatística do tamanho de amostra obtido foi realizada por meio do modelo matemático $n^* = s^2/(d/1.96)^2$ onde: n^* = tamanho de amostra; s^2 = variação do parâmetro na amostra de estudo; d = erro padrão. O tamanho de amostra obtido foi 72 que está associada às restrições estatísticas como $d = 47\%$, considerando $s^2 = 3.99$. O valor do erro padrão foi 47% porque o tamanho de amostra usada para estimar a duração do ciclo gonotrófico era 72. O valor da variância = 3.99 foi obtido a partir dos dados das coortes usadas no experimento.

3.6 DENSIDADE

Uma foto aérea (ANEXO 4 – FIGURA 1) foi usada para projetar os protocolos 1, 2 e 3 de Marcação, Soltura e Recaptura (MSR). Essa foto foi georreferenciada usando um GPS Garmin® e o norte geográfico foi identificado pelo norte magnético corrigido com a declinação magnética dessa área em 2005. Os tamanhos das áreas de recaptura nos protocolos de MSR em torno dos pontos de soltura foram calculados usando as informações em REISEN e col. (1991) que inferem uma distância máxima de dispersão por uma fêmea de *Cx. quinquefasciatus* de 1000 metros a partir do ponto de soltura associada à dispersão ativa em busca de alimento sanguíneo. Para a aplicação dos protocolos de MSR, supôs-se o seguinte: as fêmeas marcadas se distribuíram aleatoriamente na população; a probabilidade para capturar uma fêmea marcada é igual a de capturar uma fêmea não-marcada na população; a duração da coleta com o aspirador à bateria não afeta a probabilidade acima; não há perdas significativas no grupo de fêmeas marcadas; não há emigração ou imigração ou morte ou nascimento significativos na população de campo durante o experimento.

As fêmeas recapturadas, marcadas e não-marcadas, foram utilizadas para estimar a densidade da população de fêmeas segundo o índice de Lincoln corrigido por BAILEY (1952) para amostras de pequeno tamanho. Abaixo, apresenta-se esse modelo determinístico no qual a estimativa de P é obtida por meio de um único evento de marcação.

$$P = \frac{a(n+1)}{r+1} \qquad V = \frac{a^2(n+1)(n-r)}{(r+1)^2(r+2)}$$

a = número de mosquitos marcados.

n = número total de mosquitos na segunda amostra.

r = número de mosquitos marcados na segunda amostra.

v = variância.

3.6.1 Teste do aspirador

Adultos vivos de *Cx. quinquefasciatus* foram marcados com pó fluorescente Bioquip Products Inc.[®] de cor azul dentro de um recipiente fechado de vidro que foi choacoalhado. Os mosquitos foram submetidos a 20 minutos de aspiração contínua no aspirador que foi usado nas coletas de campo.

3.6.2 Teste preliminar de sobrevivência

Esse teste é realizado com o intuito de testar a sobrevivência das fêmeas marcadas em comparação às não-marcadas nas mesmas condições de laboratório. Coletou-se 144 larvas L₄ do rio Negrinho que foram transportadas com a água do criadouro em recipientes para o laboratório.

A seguir, as larvas foram transferidas para recipientes com água destilada e alimentadas com ração para peixe durante dois dias. Um lote com 69 pupas, 28 fêmeas e 41 machos, foi colocado em uma gaiola onde os adultos recém-emergidos foram marcados com pó fluorescente de cor azul. Outro lote com 52 pupas, 19 fêmeas e 33 machos, foi colocado em outra gaiola onde os adultos recém-emergidos permaneceram não-marcados constituindo o grupo-controle. Esses lotes (ANEXO 4 – FIGURA 2) foram acompanhados até a morte do último mosquito de cada lote. A hipótese foi que a marcação não afetava a sobrevivência dos mosquitos. As fêmeas foram alimentadas com solução açucarada a 10% e com sangue uma vez por semana.

3.6.3 Marcação, soltura e recaptura – protocolo 1

De cinco a catorze de maio de 2006, uma amostra de espécimes de imaturos de *Cx. quinquefasciatus* foi coletada do canal poluído com uma concha entomológica (ANEXO 4 – FIGURA 3). Quatro mil imaturos foram transportados ao laboratório onde foram transferidos em recipientes contendo água de torneira. Todas as pupas dentro dos recipientes foram colocadas nas gaiolas onde emergiram os adultos. As fêmeas adultas foram transferidas às gaiolas de marcação e soltura. Essa gaiola era de isopor forrada, internamente, com isopor. Um lote de 1.500 fêmeas foi transportado ao PET, marcado com um pó fluorescente azul e liberado na margem oeste do canal às 18h. A escolha do ponto de soltura das fêmeas marcadas foi aleatória, em 23K 343310 (W), 7400402 (S). A primeira recaptura foi realizada no dia seguinte às 9h em uma área de 4.580 m² com 155m de comprimento ao longo da margem do canal. A recaptura foi realizada com um aspirador à bateria durante 40 minutos. Foram realizadas mais oito capturas nos dias subsequentes. As amostras coletadas foram eutanasiadas (mortas) com acetato de etila e transportadas ao laboratório onde as fêmeas foram identificadas sob a luz UV e contadas.

3.6.4 Marcação, soltura e recaptura – protocolo 2

Em quatro de outubro de 2006, duas amostras de adultos foram adquiridas na borda esquerda do canal, em uma área situada entre 23K 343310 (W), 7400402 (S) e 343200, 7400340, usando aspiradores à bateria, durante o período diurno (ANEXO 4 – FIGURA 4). Uma amostra com mosquitos vivos foi colocada em uma gaiola de isopor e a outra foi eutanasiada com acetato de etila e transportada ao laboratório. A amostra com os mosquitos vivos foi liberada em um local escolhido aleatoriamente e situado em 23K 343470 (W), 7400594 (S) na borda oeste do canal. O número de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* que foram eutanasiados na outra

amostra foi usado para estimar o número de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* liberadas. Então, 4.280 fêmeas foram marcadas com pó azul (ANEXO 4 – FIGURA 5) antes que fossem liberadas às 13h (ANEXO 4 – FIGURA 6). A recaptura foi realizada em uma área de 5.040 m² com 120m de comprimento ao longo da margem oeste do canal. A recaptura foi realizada com três aspiradores à bateria durante 30 minutos às 15h. O protocolo 2 foi usado outra vez e 754 fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* foram marcadas com pó fluorescente amarelo (Bioquip[®]) e liberadas no mesmo local às 3h30'. A recaptura foi realizada em uma área de 2.520 m² com 60 m de comprimento ao longo da margem oeste do canal durante 15 minutos às 16h (ANEXO 4 – FIGURA 7). Os indivíduos recapturados foram eutanasiados com acetato de etila e transportadas ao laboratório onde as fêmeas foram identificadas sob a luz UV e contadas.

O parâmetro (a) foi estimado para os protocolos 2 e 3 de MSR usando o número absoluto de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* em uma sub-amostra (Ss) da amostra marcada e liberada (Ms) multiplicado pela duração de coleta por da amostra Ms dividida pela duração de coleta da amostra Ss.

3.6.5 Marcação, soltura e recaptura – protocolo 3

Em vinte-nove de novembro de 2006, realizou-se coleta de adultos e o número de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* marcadas e liberadas foi estimado como no protocolo 2. Um lote de 1.444 fêmeas foi marcado com pó azul e liberado no mesmo local do protocolo 2 às 13h. As recapturas foram realizadas em pontos distantes 15m e 30m do local de soltura. Antes da recaptura, a velocidade e sentido do vento foram medidos usando um anemômetro. A recaptura foi conduzido em uma área de 2.826 m² e a vegetação em cada local foi aspirada por dois minutos usando aspiradores à bateria às 15h. Os indivíduos recapturados foram eutanasiados com acetato de etila e transportadas ao laboratório onde as fêmeas foram identificadas sob a luz UV e contadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MANUSCRITO 1

Density and survival rate of *Culex quinquefasciatus* (Díptera, Culicidae) population at Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil.

Submetido ao *Journal of the American Mosquito Control Association*.

Dear Dr. Laporta,

This will acknowledge receipt of the paper entitled “Density and survival rate of *Culex quinquefasciatus* population at Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil,” which will be sent out for review shortly. I will be writing to you again after the reviews have been received.

In any further communication, the reference number is MS No. 5664.

Sincerely,

Lal S. Mian, Ph.D.

Editor, JAMCA

Department of Health Science & Human Ecology

California State University

San Bernardino, CA 92407-2397

Phone: (909) 537-7409

Fax: (909) 537-7037

E-mail: edjamca@csusb.edu

Density and survival rate of *Culex quinquefasciatus* (Díptera, Culicidae) population at Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil.

GABRIEL ZORELLO LAPORTA^{1,2} and MARIA ANICE MUREB SALLUM¹

¹ Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

² Current fellow of FAPESP, process number 06/53061-3.

Corresponding author: Maria Anice Mureb Sallum, Avenida Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: masallum@usp.br

Abstract. This investigation aims to estimate parity rate, gonotrophic cycle length and density of a *Culex quinquefasciatus* female population at the Parque Ecológico do Tietê (PET), São Paulo, Brazil. Adult *Cx. quinquefasciatus* females were collected from vegetation along the edges of a polluted drainage canal using a battery-powered backpack aspirator from September 2005 until June 2006. We dissected and examined 826 *Cx. quinquefasciatus* ovaries to establish the parity stage. We established the gonotrophic cycle length using a mosquito female cohort under laboratory conditions. We estimated *Culex quinquefasciatus* survival rate by means of a mathematical model which employed the data obtained in the parity rate and gonotrophic cycle length experiments. The local density of the *Cx. quinquefasciatus* female population was estimated by a mark-release-recapture (MRR) method using 3 distinct protocols. The proportion parous/n, gonotrophic cycle length, and survival rate were, respectively, equal to 0.48, 4.75 (CL 95% = 4.3-5.2) and 0.86, estimated for the *Cx. quinquefasciatus* female population. According to the results of the MRR experiment, the estimated *Cx. quinquefasciatus* female population density varied from $7,262 \pm 1,537$ for an area equivalent to $2,520 \text{ m}^2$ to $131,404 \pm 49,163$ for an area of $2,826 \text{ m}^2$. Results of all experiments indicate high survivorship and high density for the *Cx. quinquefasciatus* female population. The polluted canal is a highly productive larval habitat for *Cx. quinquefasciatus*. This species is epidemiologically relevant in the PET area as either a pest or vector species. Consequently, control of this species should be a goal of the vector control program of Sao Paulo municipality.

Keywords. Neotropics, Culicidae, vectorial capacity, ecology

Introduction

Culex quinquefasciatus Say is a cosmopolitan mosquito that has adapted to the urban environment. Due to high synanthropy (Forattini et al. 2000) and nocturnal hematophagic activity (Marquetti et al. 1986), adult females of *Cx. quinquefasciatus* infest human dwellings during the night causing painful bites. According to Merritt et al. (1992), all 4 larval stages of this species are collecting-filtering feeders adapted to living in polluted water. This adaptation is advantageous because natural predators of the species do not survive in anoxic aquatic habitats (Urbinatti et al. 2001). Additionally, *Cx. quinquefasciatus* immature stages were found in clean water associated with *Aedes aegypti* Linnaeus (Stein et al. 2002).

Culex quinquefasciatus was demonstrated to be a competent vector for West Nile virus (WNV) (Goddard et al. 2002), which has been circulating in North America since 1999 (CDC 1999). Furthermore, WNV has been isolated from pools of *Cx. quinquefasciatus* in Mérida and Yucatán, Mexico (García-Rejón et al. 2006). There is a possibility of the introduction of WNV into Brazil, and *Cx. quinquefasciatus* can be a potential vector (Natal & Ueno 2004). Furthermore, in Brazil, this species is already a vector of *Wuchereria bancrofti* Cobbold (Rocha & Fontes 1998) in Salvador, Maceio, Recife, Olinda, and Belém and of *Dirofilaria immitis* Leidy (Labarthe 1997; Alves et al. 1993; Ahid et al. 1999) in Florianópolis, Rio de Janeiro, Recife, and São Luís.

In order to estimate vectorial capacity of a mosquito species population, it is necessary to know the population density and the survival rate. The latter can be estimated employing data showing parity rate and gonotrophic cycle length. Information about population density and survival rate of *Cx. quinquefasciatus* is unknown in São Paulo municipality. The Parque Ecológico do Tietê (PET) is an area of environmental protection where *Culex quinquefasciatus* proliferate intensively in a polluted larval habitat near a residential area (Urbiniatti et al. 2001; Laporta et al. 2006). Homeless persons, who live in precarious sanitary conditions, have moved into this area. *Culex quinquefasciatus* that infest houses in the area are a pest. This study was designed to estimate the density and survival rate of the *Cx. quinquefasciatus* population at PET, which are relevant to the design of vector control measures.

Materials and methods

Study area

PET was implemented to preserve the flood plain of the Tiete River and to offer recreational areas for the population and is administered by Sao Paulo State government and was reforested with vegetation of native species of the Atlantic forest. There are resident or migratory vertebrate animals and aquatic environments composed of canals, ponds, lakes and the Tiete River. People who live in the neighborhoods of the PET visit the area the weekends. Additionally, there is a residential area inside the park where 9,000 people live in poor sanitary conditions. The field work was carried out

between geodesic coordinates 23K 343000 (W), 7399900 (S) and 23K 343575 (W), 7400700 (S), along the right edge of a drainage canal. The water in the canal is highly polluted by sewage. The west margin of the canal is covered with bushy vegetation, and the east margin is occupied by human habitations. Our results indicated that vegetation along the canal edges represents a resting place for *Cx. quinquefasciatus* population (Laporta et al. 2006).

Sampling design

Estimating parity rate

Adult sampling was carried out monthly on vegetation on the west side of the polluted canal, in the morning, from September 2005 to June 2006. An aerial photo of the area (Fig. 1) was divided in twenty possible collections sites (1 to 20). One of them (5) was chosen randomly and it was considered to be representative of the canal. Twenty-min collections were carried out using a battery-powered backpack aspirator to capture *Cx. quinquefasciatus* females in their resting places. Live adult females were taken to the laboratory and had their ovaries dissected. The female was anesthetized with ethylic ether, placed on a microscope slide and examined under a stereomicroscope, and then its ovaries were separated from the abdomen. Both ovaries were put in distilled water and examined at 100 X magnification. Each female was identified either as nulliparous or parous, following the criterion of the Classical School (Charlwood et al. 1980). A female with ovaries classified in Christophers's (1911) phase I to IV without distension on tracheal ramifications was considered nulliparous and those with distension,

parous. A female in phase V (pregnant) was considered parous because she was ready to lay eggs. This last assumption is based on two facts: the first adult female dead in the survivorship experiment was six days old; there is no predators of this species in the study area, according to Urbinatti et al. (2001). Females were dissected up to 2 days after the field collection to avoid bias in the identification of the ovarian development phase. Some 100 females of each month's collection were dissected. In those months when less than 100 females were collected, all females were dissected and had both ovaries examined. When one of the ovaries was nulliparous and the other parous, the female was considered to be parous.

Sample size determination was carried out employing a mathematical model to estimate the proportion of parous *Cx. quinquefasciatus* females in the population. It was $n^* = P.Q/(d/1.96)^2$ where: n^* = minimum sample size to permit an estimate in a given precision; P = previous value of the proportion to be estimated; $Q = 1 - P$; $P.Q$ = previous variance of the parameter in the population; d = standard error which represents the precision of the estimate; 1.96 = confidence level of 95% that represents the probability to contain the real parameter of the population. Consequently, the minimum sample size was 384 females with $d = 5\%$ and $P.Q = 0.25$. Because the $P.Q$ was not possible to know in advance, the greatest value of variance was chosen for the selected precision.

Estimating gonotrophic cycle length

According to Urbinatti et al. (2001), *Cx. quinquefasciatus* is the only Culicidae species that occur in the sewage-polluted canal. Fourth instar

larvae and pupae of *Cx. quinquefasciatus* were taken from the canal using an entomological dipper. Material was taken to the laboratory and pupae kept separate in 4 cages that made up the 4 *Cx. quinquefasciatus* cohorts. Each cohort had males and females, and the sex ratio was 3:2 for males. The sex ratio was selected according to Olejnicek & Gelbic (2000) to assure the copulation essential for females to oviposit viable eggs. Adult females were blood-fed during the night on a mouse (*Mus musculus*) immobilized inside a cone-shaped frame. A container for ovipositing and a vial filled with a 10% sugar solution were maintained inside the cages during the experiment, except when the insects were blood fed. We followed the activity in the cage for a month. During that period, we observed the presence of eggs on water's surface. The length, in days, of the first gonotrophic cycle for each cohort of engorged female was estimated as the interval between blood-feeding and oviposition. Mosquitoes were kept in 14 hours of light / 10 hours of dark. Temperature and relative humidity data were recorded using a thermometer and a hygrometer that detected heat and humidity from the air inside the laboratory.

The variance of gonotrophic cycle length for *Cx. quinquefasciatus* female in the sample obtained (n=72) was 3.99. Size of this sample had statistical restrictions that were determined employing a mathematical model was $n^* = s^2/(d/1.96)^2$ where: n^* = sample size; s = variance of the parameter in the sample; d = standard error. This sample size had a standard error of 47% which means that the real gonotrophic cycle length can be one day below or above of the estimate gonotrophic cycle length.

Estimating population density

The mark-release-recapture (MRR) method used to obtain information permits an estimate of the density of the population. This method was applied to *Cx. quinquefasciatus* populations by Macdonald et al. (1968) and Reisen et al. (1992). Before the MRR experiment, a survivorship experiment was conducted employing *Cx. quinquefasciatus* under laboratory conditions. The objective was to compare a group of marked females with a group of unmarked females. The hypothesis was that marking females with phosphorescent powder did not affect survivorship of the insect. Both groups of females were observed until the death of the last mosquito.

An aerial photo was used to design the MRR protocols 1, 2 and 3. This aerial image was geo-referenced using a GPS (Global Positioning System) Garmin® and geographical north was identified using the value of the magnetic north corrected by the magnetic declination of this area in 2005. The size and the location of the recapture areas in the MRR experiments were selected using this aerial image, and 3 distinct protocols were applied as shown in Figure 1. According to Reisen et al (1991), the maximum distance traveled by a *Cx. quinquefasciatus* female from the release point is 1000 m per day, a distance used for selecting the size of the recapture area around the release site in the MRR protocols. To apply a MRR protocol, the following is proposed: marked females distributed themselves freely in the population; the probability of capturing a marked female is equal to the capture of an unmarked female in the population; the duration of collection for recapturing the released females by battery-powered backpack aspirator

does not affect the probability above; there are no significant losses in the group of marked females; there are no significant emigration or immigration or deaths or births of females in the population during the experiment.

In the Protocol 1 applied from 5th May to 14th May 2006, a sample of immature specimens of *Cx. quinquefasciatus* was taken from the polluted canal with an entomological dipper. Some 4000 immatures were transported to the laboratory where they were transferred to receptacles filled with tap water. All pupae were set in cages where they emerged to adults. Four days old adult females were transferred to a marking-release cage. This cage was made of polystyrene covered inside with dry plaster powder mixed with water. Some 1500 females were collected in the PET, marked with a blue luminous powder (Bioquip Products Inc®) and released on the west margin of the canal at 6 p.m. The choice of a location for release the marked adult females was random, at 23K 343310 (W), 7400402 (S). The first recapture was carried out on the next day at 9 a.m. in an area of 4,580 m² with a length of 155m along the margin of the canal. The recaptures were carried out with 1 backpack aspirator during 40 minutes. The second through ninth recaptures were carried out on subsequent days. The collected samples were euthanized with ethyl acetate and transported to the laboratory where the marked and unmarked females were identified under UV light and counted.

In Protocol 2 applied on 4th of October, 2006 , 2 samples of adult specimens were collected during the morning on the west edge of the canal in an area located between 23K 343310 (W), 7400402 (S) and 343200,

7400340, using backpack aspirators. One sample collection was kept alive in a cage made of polystyrene, and the other was killed with ethyl acetate and taken to laboratory. The sample with the live mosquitoes was released in a site chosen randomly and located at 23K 343470 (W), 7400594 (S) on the west edge of the canal. The number of *Cx. quinquefasciatus* females killed in the other sample was used to estimate the number of *Cx. quinquefasciatus* females released. Then, around 4,280 adult females were marked with blue luminous powder before they were released at 1 p.m. The recapture was made in an area of 5,040 m², 120m long on the west margin of the canal. The recaptures were carried out with 3 backpack aspirators during 30 minutes at 3 p.m. Protocol 2 was used again and 754 *Cx. quinquefasciatus* females were marked with yellow luminous powder (Bioquip Products Inc®) and released at the same site at 3:30 p.m. The recapture was carried out in a 2,520 m², 60 m long along the west margin of the canal during 15 minutes at 4 p.m. Recaptured individuals were killed with ethyl acetate and taken to the laboratory where marked and unmarked females were identified under UV light and counted.

In Protocol 3, applied on 29th November 2006, adult specimens were captured and the number of *Cx. quinquefasciatus* females marked and released was estimated as in protocol 2, and around 1444 adult females were marked with blue luminous powder and released at the same site as Protocol 2 at 1 p.m. Marked females were recaptured 15 m and 30 m distant from the release site. Before the recapture, the speed and direction of wind were recorded using an anemometer. Recapture was conducted in a 2,826

m² area and the vegetation on each site was aspirated for 2 minutes using backpack aspirators at 3 p.m. Mosquito samples were killed and taken to the laboratory where they were examined with UV light.

Analysis

The survival rate of *Cx. quinquefasciatus* female population was estimated employing Davidson's (1954) mathematical model. In this model, the root of the gonotrophic cycle length (g) of the proportion of the parous females (parous/n) represents numerically the survival rate (S). A bivariate correlation test was performed to compare the death in both marked females and unmarked females with 0.05 of significance level.

The number of marked and released females (a), the number of marked females in second sample (r) and the total number of marked and unmarked females (n) in second sample were used to estimate the density of the *Cx. quinquefasciatus* female population (P). The estimate of the population (P) was obtained from a single marking occasion using the Lincoln Index, $P = an / r$ with variance $(P) = a^2n(n-r) / r^3$. If $r < 20$ then Bailey's (1952) correction is applied, $P = a(n+1) / r+1$ with variance $(P) = a^2(n+1)(n-r) / (r+1)^2(r+2)$.

The parameter (a) was estimated for the MRR Protocols 2 and 3 using the absolute number of *Cx. quinquefasciatus* females in a sub-sample (Ss) of the marked and released captured sample (Ms) multiplied by the duration of collection for capturing the Ms divided per duration of collection for capturing Ss.

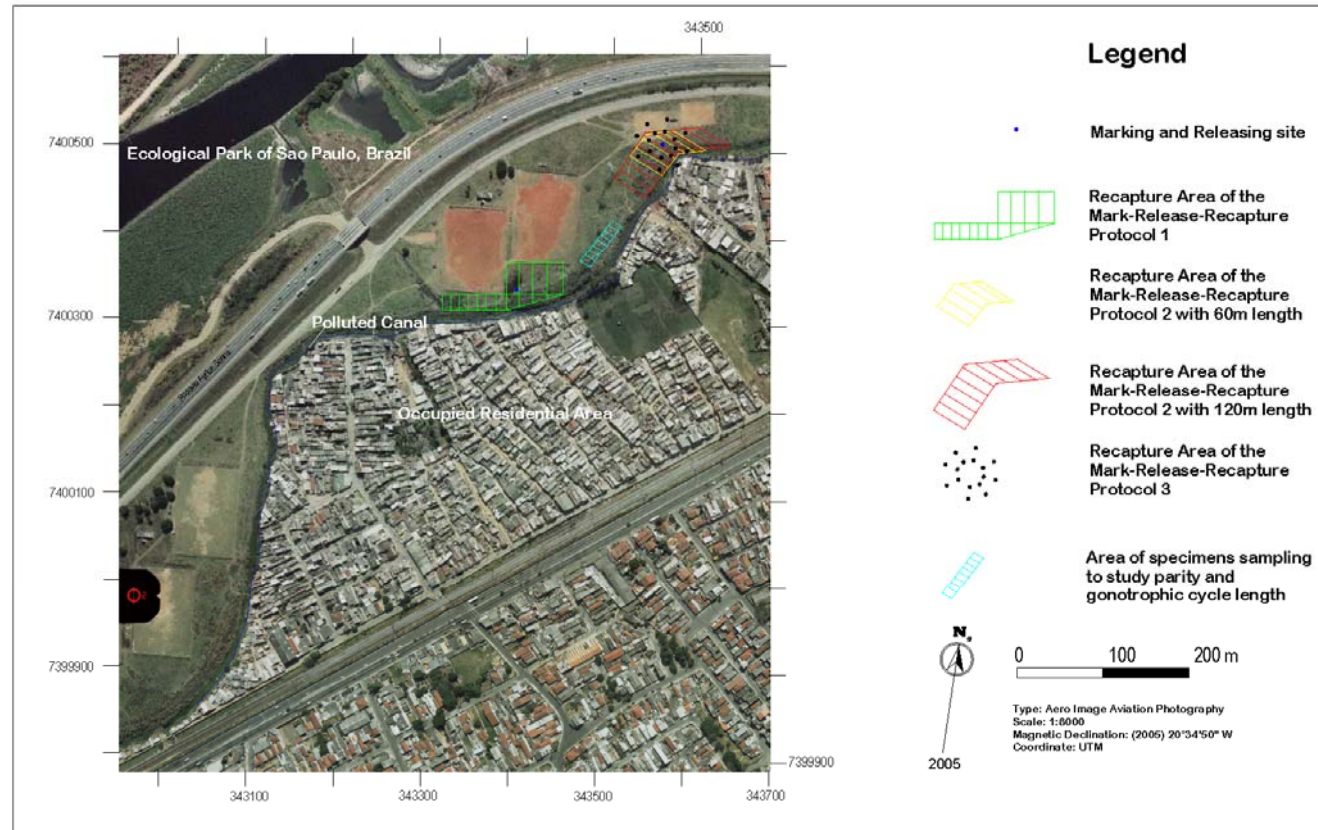


Figure 1. Distribution of sampling areas on aero image aviation photography by MRR protocols and survival study, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil, Sep/05 to Dec/06.

Results

Culex quinquefasciatus females were identified in the laboratory during the parity experiment with relative frequency of 95.0% from the adult samples collected in the study area. A total of 826 *Cx. quinquefasciatus* females was identified and dissected (Table 1).

Table 1. Distribution of absolute and relative numbers of dissected females by date of adult sampling and parity rate, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil, Sep/05 to Jun/06.

| Month of Adult Sampling | Parity rate | | Total |
|-------------------------|-----------------|------------|-------|
| | Nulliparous (%) | Parous (%) | |
| September | 56 (56) | 44 (44) | 100 |
| October | 30 (30) | 70 (70) | 100 |
| November | 58 (58) | 42 (42) | 100 |
| December | 44 (44) | 56 (56) | 100 |
| January | 4 (10) | 36 (90) | 40 |
| February | 41 (54) | 35 (46) | 76 |
| March | 91 (91) | 9 (9) | 100 |
| April | 91 (91) | 9 (9) | 100 |
| May | 9 (36) | 16 (64) | 25 |
| June | 4 (5) | 81 (95) | 85 |
| Total | 428 (52) | 398 (48) | 826 |

Females with ovaries as shown in Fig. 2-A were considered nulliparous. In contrast Figures 2-B and 2-C show the ovaries of parous females.

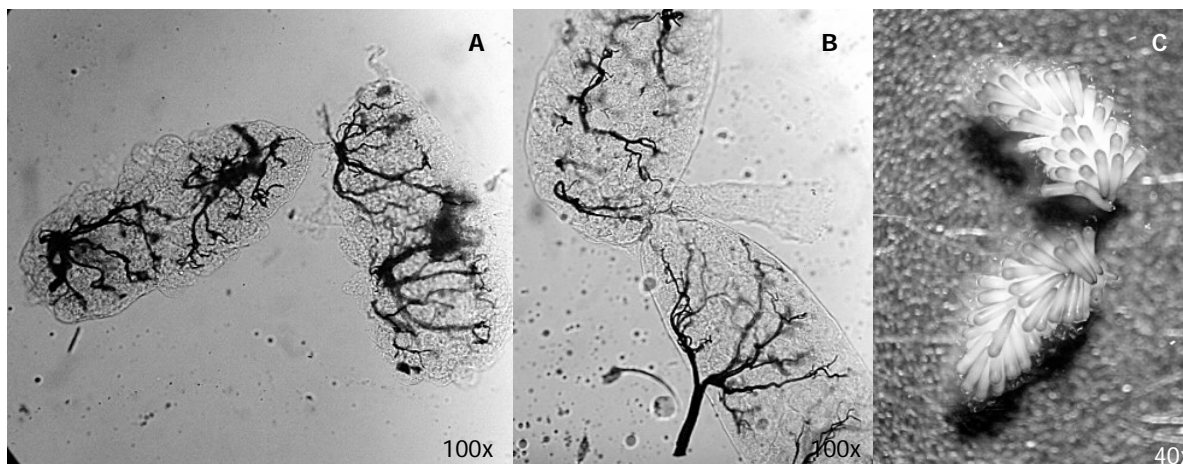


Figure 2. Digital images of the physical state of *Cx. quinquefasciatus* female's ovaries according with nulliparity (A) and parity (B) and (C), Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil, Sep/05 to Oct/06.

The use of distilled water instead of a physiological solution gave interesting results because the former is a hypotonic and thus increases the cell size permitting better analysis of the ovarian morphology during the first minute of observation. Of all *Cx. quinquefasciatus* females dissected, 398 (48%) were parous, and then the parameter parous/n estimated was 0.48 with CL95% = 0.45-0.51 for *Cx. quinquefasciatus* female population with a precision previously determined.

We got 694 immatures to emerge as adults from the fourth instar larvae and pupae collected from the polluted canal. Those immatures were subdivided into 4 cohorts of male and female adults. Then, cohorts 1, 2, 3 and 4 were composed, respectively, of 91 male (M), 62 female (F), 81M: 64F, 108M: 79F and 117M: 92F. At the end of the experiment, the mosquitoes remaining alive in cohorts 1, 2, 3 and 4 were, respectively, 77M:33F, 68M:28F, 96M:50F and 112M:85F. The mean temperature and the relative

humidity were $26.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$ and $58.1 \pm 4.3\%$ in laboratory during the experiment. All females fed on a mouse maintained inside the cage between 6 p.m. and 8 a.m. Cohorts 1, 2, 3 and 4 contained, respectively, 30, 40, 12 and 45 blood-fed females. All females laid eggs on the water's surface inside a container maintained inside the cage between 6 p.m. and 8 a.m. From all 127 blood-fed females, 72 laid eggs until 10 days, 18 laid eggs between 10 and 20 days, and 37 did not lay eggs until the end of experiment. The distribution of the frequencies of gonotrophic cycle length from the 72 females that laid eggs until 10 days are shown in Table 2 that contains $\mu_x = \sum x_i \cdot f_i / \sum f_i = 72$ and $s_x^2 = (\sum (x_i - \mu_x)^2 f_i) / \sum f_i - 1 = 3.99$. The gonotrophic cycle length for 72 *Cx. quinquefasciatus* females was equal to 4.75 with $CL95\% = 4.3-5.2$ in the precision previously determined. Applying Davidson's mathematical model, where $g = 4.75$ and $\text{parous}/n = 0.48$, the survival rate (S) for *Cx. quinquefasciatus* female population in the EP was 0.86, which means that for each 100 females in the population 86 females survived at least 1 day, while 14 died before completing a day of life.

Table 2. Distribution of absolute frequency of oviposition by gonotrophic cycle length, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil, Dec/06.

| Gonotrophic cycle length (x_i) | Frequency of oviposition (f_i) | $x_i \cdot f_i$ | $(x_i - \mu_x)^2 f_i$ |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 3 | 30,00 | 90,00 | 91,88 |
| 4 | 10,00 | 40,00 | 5,63 |
| 5 | 11,00 | 55,00 | 0,69 |
| 6 | 5,00 | 30,00 | 7,81 |
| 7 | 6,00 | 42,00 | 30,38 |
| 8 | 7,00 | 56,00 | 73,94 |
| 9 | 1,00 | 9,00 | 18,06 |
| 10 | 2,00 | 20,00 | 55,13 |
| Total | 72,00 | 342,00 | 283,50 |

The cohorts of marked females (28) and unmarked females (19) were followed up for 106 days in the laboratory. The deaths of the marked females were correlated with the deaths of the unmarked females, and the bivariate correlation indicated a significant two-tailed Spearman correlation coefficient of 0.987 ($p=0,000$), indicating that the survival of a marked *Cx. quinquefasciatus* female group was not affected by painting the individuals with fluorescent powder.

In the MRR protocol 1, among all immature collected 1,500 nulliparous females were marked and released on the west edge of the polluted canal. No marked females were collected in this protocol; however, a large number (1,366) of unmarked females were identified in the first recapture. The number of unmarked females was above 1000 in the second (1,330), third (1,508), fourth (1,452), fifth (1,004), sixth (1,026), seventh (1,158), eighth (1,894) and ninth (1,635) recaptures.

In the MRR protocol 2, the samples used to estimate the number of released females, marked with blue and with yellow powder, contained, respectively, 541 and 127 *Cx. quinquefasciatus* females that were multiplied by proportions (duration of collection for capturing the Ms divided per duration of collection for capturing Ss) 8 and 6. There were 36 blue and 18 yellow-marked females recaptured in this experiment and, respectively, 279 and 182 of unmarked females. In the MRR protocol 3, the parameter (a) was estimated as in the MRR protocol 2 and the sub-sample contained 394 multiplied by 4 (the same proportion considered above). There were 5 and

545 marked and unmarked females, respectively. The speed (3 m per second) and the direction of the wind (NE) did not affect the dispersion of marked females because 2 and 1 of all recaptured females were, respectively, at southwest and southeast. In the MRR protocol 2, there were 48 and 8 marked females that died before the release in the cages with, respectively, the blue and yellow groups of females and 924 marked females that died before the release in the MRR protocol 3. These numbers were then used to subtract the estimate of the parameter (a). Consequently, the numbers of marked and released live females coated with blue and yellow powder in Protocol 2 were, respectively, 4280 and 754 and in Protocol 3, 1444. Table 3 summarizes the results from the MRR protocols 2 and 3.

The density of *Cx. quinquefasciatus* female population in the PET was estimated in Protocol 2 with 120m long equal to $33,170 \pm 5,159$ for an area of $5,040 \text{ m}^2$, in Protocol 2 with 60m long equal to $7,262 \pm 1,537$ for an area of $2,520 \text{ m}^2$ and in Protocol 3 equal to $131,404 \pm 49,163$ for an area of $2,826 \text{ m}^2$ along the west edge of the canal.

Table 3. Distribution of absolute frequency of *Cx. quinquefasciatus* female released, recaptured, captured and estimated by protocol of MRR, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil, May to Oct/06.

| Protocols | a | r | n | P | SD |
|-----------|-------|----|-----|---------|--------|
| 2 | 4,280 | 36 | 279 | 33,170 | 5,159 |
| 2 | 754 | 18 | 182 | 7,262 | 1,537 |
| 3 | 1,444 | 5 | 545 | 131,404 | 49,163 |

(a): Number of marked and released females;

(r): Number of marked females in second sample;

(n) Total number of marked and unmarked females in second sample;

(P): Size of *Cx. quinquefasciatus* female population;

(SD): Standard deviation of (P).

Discussion

Although *Cx. quinquefasciatus* species showed autogeny in Olejnicek & Gelbic's (2000) laboratory experiment, for the present experiment this phenomenon was considered not to affect the estimate of the parous proportion because it rarely occurs in a natural population, and all females captured were dissected in 2 days. Davidson's (1954) method was proposed for *Anopheles gambiae* Giles, and in this investigation it was applied to a *Cx. quinquefasciatus* population, but that was not a limitation for this study. The technique used in this study to identify the parity stage of a female mosquito has biological plausibility because it is in accordance with a positive association between size of ovaries's follicles and distension of the ovaries's tracheal ramifications. Furthermore, the protocol used to estimate the parity of a *Cx. quinquefasciatus* population in this research should be applied during control programs for this species. For example, to release insects with a dominant lethal gene (Alphey & Andreasen 2002) should be carried out on a *Cx. quinquefasciatus* population with a higher proportion of nulliparous females. Conversely, adulticides should be used on population with a higher proportion of parous females.

Under the conditions adopted for the experiment of gonotrophic cycle length, those females that laid eggs after the 10th day after blood feeding were excluded from the analysis because feeding on sugar solution 10% may have delayed oviposition, as observed by De Meillon et al. (1967). This procedure was applied in considering the minimum sample size for estimating the parameter with precision. The follicles of females that had not

laid eggs until the end of the experiment must have degenerated. Perhaps this happens under laboratory conditions and not in the environment. Finally, this protocol could be used for vector control programs in order to use larvicides in each gonotrophic cycle of the vector population.

The parity rate (0.48) estimated in this survey indicates that half of the female population did at least 1 blood-feeding and consequently 1 oviposition. The gonotrophic cycle length (4.75, 4.3-5.2) indicates that a new generation of *Cx. quinquefasciatus* would be oviposited at intervals of 5 days. Consequently, half of this population uses the blood-meal sources from a residential area for reproduce a new generation in the polluted canal at five-day interval.

The parity rate (0.48) is close to Charlwood's (1979) estimate (0.40), and the gonotrophic cycle length (4.75 days) differed from the results of Elizondo-Quiroga et al. (2006) who estimated a gonotrophic cycle of 2 and 3 days but is, according to Charlwood (1979), 4 days. Elizondo-Quiroga et al. (2006) considered a gonotrophic cycle to be the interval between blood feeding and female pregnancy; however, this definition is in disagreement with that of Charlwood et al. (1980), who defines it as the interval between a blood feeding and an oviposition. Finally, the estimate of parity rate and gonotrophic cycle length should be used to estimate the survival rate.

The survival rate (0.86) estimated for the PET population of *Cx. quinquefasciatus* was similar to that found in Reisen et al. (1991, 1992) and Elizondo-Quiroga et al. (2006) which ranged 0.65-0.84, 0.74-0.84 and 0.87-0.88, respectively. Interestingly, the Reisen et al. (1991, 1992) and Elizondo-Quiroga et al. (2006) experiments were conducted under different field, laboratory, and statistical techniques from those adopted in this research. According to Hill (1965), one of the causality principles is the consistency which occurs between research with different methodologies but similar results. Finally, the presence of *Cx. quinquefasciatus* with a high survivorship indicates high density of this species in that area.

Results of the MRR Protocol 1 provided an imprecise estimate of the density of the *Cx. quinquefasciatus* female population. Because the marked females were released at the end of the day, they host-seek at night and probably dispersed beyond the recapture area. Also, the number of marked and released females was not approximated to the number of marked females inside the recapture area when the recapture was carried out. In Protocols 2 and 3 marked females were released a few hours before the recapture and not in a hematophagic activity period of this species. Nevertheless, the marked females in MRR Protocol 2 with 120 m long on the west edge of the polluted canal and Protocol 3 were released 2 hours before the recapture and were supposed to disperse beyond the recapture area perimeter in a mean velocity rate of 80 m per hour in agreement with Reisen et al. (1991). Thus, Protocol 2 with 60m of length on the west edge of the polluted canal has the most precise estimate of the density of *Cx.*

quinquefasciatus female population in this research because the marked females were released half hour before the recapture and the females were supposed to be inside the recapture area perimeter. Consequently, the density of *Cx. quinquefasciatus* female population ($7,262 \pm 1,537$ females for an area of $2,520 \text{ m}^2$) is, approximately, 2.88 females per m^2 , which is a high density for a vector species.

Number of dead females (924) in MRR Protocol 3 is because of a misuse of backpack aspirator bag when live mosquitoes were transferred to marking-release cage.

Conclusions

The survival rate and density of the *Cx. quinquefasciatus* female population were, respectively, 0.86 per day and 2.88 per m^2 in a polluted larval habitat near a residential area. These parameters with high values indicate the epidemiological importance of this species in an area where a control program should be carried out. The protocols of the experiments are reliable and can be applied in control programs with low budget.

Acknowledgements

This investigation received financial support from FAPESP, São Paulo, Brasil by the process number 05/53973-0, from CNPq by the process number 472485/2006-7 and from UNICEF/UNDP/World bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) by the process number A50252. Special thanks for Henry R. Rupp for analyzing the English grammar of this manuscript.

References

- Ahid SMM, Lourenço-de-Oliveira R, Saraiva LQ. 1999. *Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brazil: uma zoonose potencial. Cad Saúde Pública* 15, 405-412.
- Alphey L, Andreasen M. 2002. Dominant lethality and insect population control. *Mol Biochem Parasitol* 121, 173–178.
- Alves LC, Cole EF, Athayde ACR. 1993. Prevalência da filariose canina no bairro de Dois Irmãos, Recife, PE. *Revista Brasileira Parasitologia* 2, 68.
- Bailey NTJ. 1952. Improvements in the interpretation of recapture data. *J Anim Ecol* 21, 120-127.
- CDC - Center of Disease Control. 1999. Outbreak of West Nile-Like Viral Encephalitis -- New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48, 845-849.
- Charlwood JD. 1979. Estudos sobre a biologia e hábitos alimentares de *Culex quinquefascitatus* Say de Manaus, Amazonas, Brazil. *Acta Amazônica* 9, 271-278.
- Charlwood JD, Rafael JÁ, Wilkes TJ. 1980. Métodos de determinar a idade fisiológica em Diptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. *Acta Amazonica* 10, 311–333.
- Christophers SR. 1911. The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism*, 2, 73-89.

- Davidson G. 1954. Estimation of the survival-rate of Anopheline mosquitoes in nature. *Nature* 174, 792-793.
- De Meillon B. 1967. Cane-sugar feeding in *Culex pipiens fatigans*. *Bull World Health Organ* 36, 67-73.
- Elizondo-Quiroga A, Flores-Suarez A, Elizondo-Quiroga D, Ponce-Garcia G, Blitvich BJ, Contreras-Cordero JF, Gonzalez-Rojas JI, Mercado-Hernandez R, Beaty BJ, Fernandez-Salas I. 2006. Gonotrophic cycle and survivorship of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using sticky ovitraps in Monterrey, Northeastern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 22, 10-14.
- Forattini OP, Kakitani I, Santos RC, Kobayashi KM, Ueno HM, Fernández Z. 2000. The synanthropic potential of *Kerteszia* and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 34, 565-569.
- García-Réjon JE, Farfan-Alé JA, Loroño-Pino MA, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Chávez-Medina JM, Baak-Baak C, Fernández-Salas I, Blitvich B, Beaty B. 2006. The search for West Nile virus in *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) IN Merida, Yucatán, México. 72ND American Mosquito Control Association Annual Meeting, Detroit, Michigan.
- Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 8, 1385-1391.

- Hill AB. 1965. The environment and disease: Association or Causation. Proc R Soc Med 58, 295-300.
- Labarthe NV. 1997. Dirofilariose canina: diagnóstico, prevenção e tratamento adulticida. Revisão de Literatura. Clin Vet 10, 10-16.
- Laporta GZ, Natal D, Urbinatti PR. 2006. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. Rev Bras Entomol 50, 125-127.
- Marquetti MC, Ortega AN, Bisset JA. 1986. Estudio de la actividad hematofagica de *Culex (C.) quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae). Rev Cubana Med Trop 38, 171-178.
- Merrit RW, Dadd RH, Walker ED. 1992. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. Annals Review Entomology 37, 349-376.
- Natal D, Ueno HM. 2004. Vírus Do Nilo Ocidental: Características da transmissão e implicações vetoras. Entomología y Vectores 11, 417-433.
- Olejnicek J, Gelbic I. 2000. Autogeny in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. J Vector Ecol 25, 118-122.
- Reisen WK, Milby MM, Meyer RP, Pfuntner AR, Spoehel J, Hazelrigg JE, Webb jr. JP. 1991. Mark-release-recapture studies with *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southern California. J Med Entomol 28, 357-371.

- Reisen WK, Milby MM, Meyer RP. 1992. Population dynamics of adult *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) along the Kern river, Kern County, California, in 1990. *J Med Entomol* 29, 531-543.
- Rocha EMM, Fontes G. 1998. Filariose bancroftiana no Brazil. *Rev Saude Publica* 32, 98-105.
- Stein M, Oria GI, Almirón WR. 2002. Principales criaderos para *Aedes aegypti* y culicídeos asociados, Argentina. *Rev Saude Publica* 36, 627-630.
- Urbinatti PR, Sendacz S, Natal D. 2001. Immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a public city park. *Rev Saude Publica* 35, 461-466.

4.2 MANUSCRITO 2

Epidemiological importance of host-feeding habits of *Culex nigripalpus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) females detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay technique at Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil

A ser submetido às Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Epidemiological importance of host-feeding habits of *Culex nigripalpus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) females detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay technique at Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil

Gabriel Z Laporta^{*/++}, Thaís B Crivelaro^{*}, Elaine C Vicentin^{*}, Priscila Amaro^{**}, Maria S Branquinho ^{**}, Maria Anice M Sallum^{*/++}

^{*} Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Av. Dr. Arnaldo 715, 01246-904 São Paulo, SP, Brasil.

^{**} Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria Estadual de Saúde, São Paulo, SP, Brasil

+ GZL is a current fellow of FAPESP by the process number 06/53061-3.

++ Corresponding author: masallum@usp.br; gabrielzorelo@usp.br

Abstract

Studies were conducted to determine host feeding patterns of *Culex quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* in Parque Ecológico do Tietê (PET), São Paulo State, Brazil. Human, dog, chicken and rodent (rat) bloods were detected in female mosquito guts by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Culex quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* fed on human 6.5 and 8.3%, dog 18.8 and 27.7%, chicken 7.4 and 2.3%, rat 2.8 and 9.0%, multiple hosts 3.2 and 8.2% and unidentified hosts 67.7 and 60.9%, respectively. The unweighted human blood index (HBI) values were 0.20 for *Cx. quinquefasciatus* and 0.17 for *Cx. nigripalpus* populations. The feeding index values between the hosts human/dog, human/chicken and human/rat were, respectively, 0.35, 0.63 and 2.65 for *Cx. quinquefasciatus* and 0.30, 2.56 and 1.05 for *Cx. nigripalpus*. The distributions of blood-meals had statistically significant association on Sella 2 stage of the *Cx. nigripalpus* collected in all areas at the PET. Dogs and chickens are important hosts for *Cx. quinquefasciatus*, whereas dog is an important host for *Cx. nigripalpus*. The host-blood is better detected by indirect ELISA assay when females are in Sella 2 stage.

Key words: ELISA – Brazil - Culicidae – Public Health – Ecology - Zoology.

Introduction

Culex quinquefasciatus Say and *Culex nigripalpus* Theobald transmit arboviral and other pathogens throughout the Americas (Forattini, 2002). *Cx. quinquefasciatus* is a pest in Brazilian urban areas and a competent vector of *Wuchereria bancrofti* in northeast Brazil (Brito et al., 1997); *Dirofilaria immitis* Leidy (Labarthe 1997; Alves et al., 1993; Ahid et al., 1999) in Florianópolis, Rio de Janeiro, Recife, and São Luís; St. Louis encephalitis (SLE) (Akey et al., 1983); and West Nile virus (WNV) (Goddard et al., 2002) in North America. *Cx. nigripalpus* is vector of SLE (Sudia & Chamberlain, 1964) and WNV (Sardelis et al., 2001) in North America and Venezuelan equine encephalitis (Mendéz et al., 2001) in Venezuela.

Studies on mosquito host-feeding have become an important tool for vector-borne disease control programs since Garrett-Jones' (1964) publication in which he proposed a human blood index (HBI). *Cx. quinquefasciatus* feeds on humans, birds, dogs, cats, rabbits, horses, and cattle (Forattini et al., 1987; Beier et al., 1990; Reisen et al., 1990; Niebylski & Meek, 1992; Labarthe et al, 1998; Samuel et al., 2004; Zinser et al., 2004). Although birds are important hosts for *Cx. nigripalpus* (Edman & Webber, 1975; Guimarães et al., 1985), the species feeds on a wide range of hosts (Gomes et al., 2003) and might have multiple host contacts during blood feeding (Anderson & Brust, 1995). The Parque Ecológico do Tietê (PET), described below, is an Area of Environmental Protection with resident and migratory mammals and birds, which may be blood sources for females of *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus*.

There are arboviral pathogens circulating at PET (Eloy et al., 2001); however, the host-feeding habits of *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* have not been investigated by employing an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Consequently, this study aims: 1) to investigate the blood-feeding on humans, dogs, chickens, and rats; 2) to calculate the HBI and the feeding index; 3) to compare the Sella stage and results of the ELISA; and 4) to examine the influence of seasonality of *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* populations in PET, São Paulo, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

Parque Ecológico do Tietê was created in 1976, with the goal of maintaining the the Tietê River floodplain and offering a leisure area for the local community. The PET is administered by São Paulo State government and was established as Area of Environmental Protection in 1987 (Ecotiete, 2007). The area was reforested with native species of the Atlantic forest (Figure 1).

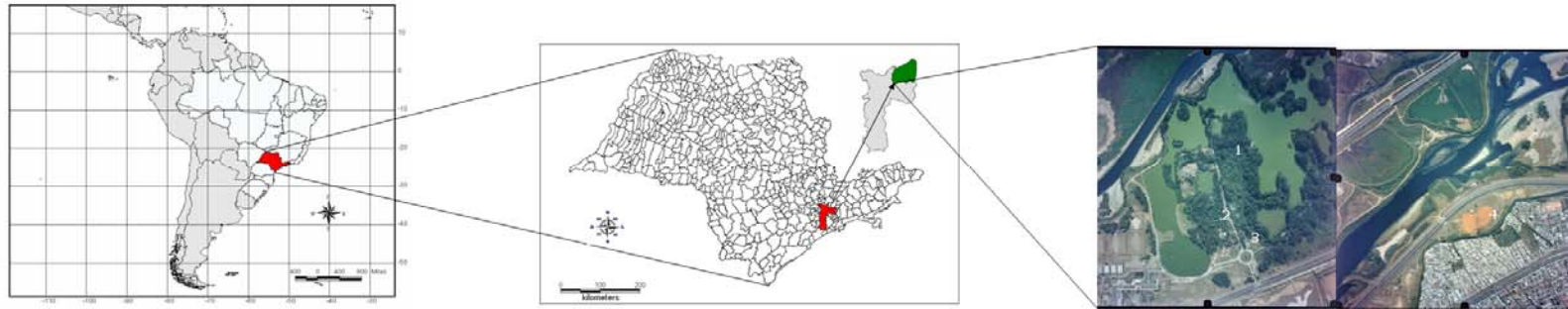


Figure 1 - Maps of South America and São Paulo State and digital images of Parque Ecológico do Tietê with sampling areas 1, 2, 3 and 4

The mammalian fauna present in the center of animal care and reception is represented by New World monkeys, tiger cat (*Carnivora: Felidae*), white-lipped peccary (*Artiodactyla: Tayassuidae*), six-banded armadillo (*Cingulata: Dasypodidae*), tapirs (*Perissodactyla: Tapiridae*), crab-eating fox (*Carnivora: Canidae*), crab-eating raccoon (*Carnivora: Procyonidae*) and dog (*Carnivora: Canidae*). The free-running animals in a restricted area of the PET are represented by New World monkeys, hedgehog (*Erinaceomorpha: Erinaceidae*), common agouti (*Rodentia: Dasiproctidae*), coati-mundi (*Carnivora: Procyonidae*), ferret (*Carnivora: Mustelidae*), opossum (*Didelphimorphia: Didelphidae*), collared peccary (*Artiodactyla: Tayassuidae*), deer (*Artiodactyla: Cervidae*), nine-banded armadillo (*Cingulata: Dasypodidae*), otter (*Carnivora: Mustelidae*), coypu (*Rodentia: Myocastoridae*), water hog (*Rodentia: Caviidae*), Brazilian agouti (*Rodentia: Dasiproctidae*), and rat (*Rodentia: Muridae*). Birds are represented by about 95 species (Barbosa & Cardoso, 2005) as well as chickens (*Galliformes: Phasianidae*). *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* can blood-feed on these animals and, thus, a host-feeding pattern investigation may indicate the animal group most susceptible for these mosquitoes species.

Collection data

The sampling areas 1, 2, 3 and 4 were selected on the basis of previous Culicidae studies which showed frequency variation of *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* among different areas of PET (Urbinatti et al., 2001; Taipe-Lagos & Natal, 2003; Laporta et al., 2006).

Sampling area 1 is at geodesic coordinates on 23K 344659 W and 7401442 S. There is a lake and some native vegetation of the Atlantic Forest but with a predominance of eucalyptus trees. Area 2 is situated at 23K 344670 W and 7401215 S. This area was reforested with species of the Atlantic Forest and is next to the animal reception and care center. Areas 1 and 2 are not accessible to the public because wild animals are maintained there. Area 3 is located at 23K 344771 W and 7401215 S. It is an open area next to Area 2. Area 4 is an occupied residential area that can be localized at 23K 0343041 W and 7400206 S. There is a drainage canal which receives sewage from the houses of squatters who have settled (or invaded) in the area (Figure 1).

Mosquito blood-feeding

Adult sampling was carried out monthly on vegetation, using a 12-V battery-powered backpack aspirator in areas 1, 2, 3, and 4, in the morning from June 2005 to May 2006. Mosquito samples were transported to the laboratory, where blood-fed females were identified and individually stored into 2-ml plastic vials containing silica. An external label identified the species. For each blood-fed female, we recorded the external appearance of the abdomen according to Sella's criterion, the collection area, and date. Blood-fed females in silica were stored at room temperature until they were processed using indirect ELISA. Each female was ground up in a 2-ml vial containing 150 μ l of phosphate-buffered saline pH 7.2 (PBS). Samples were either tested immediately or frozen at -20° C.

Indirect enzyme linked immunosorbent assay

Blood contains host specific antibodies which are detectable by the ELISA. This assay was standardized in March 2005 according to Beier et al. (1988), Chow et al. (1993), Grieco et al. (2002), and Zinser et al. (2004). Blood-fed females were tested using commercial IgG antisera kits for human, dog, chicken, and rat (Kierkegaard & Perry Laboratories Inc.). Flexible polyvinyl chloride 96-well Costar™ microtitre plates were coated for 1 h at room temperature with the individual antiserum of the hosts and 50 µL of PBS 1x (phosphate-buffered saline) pH 7.2. Following incubation, the plates were blocked with PBS-T plus Molico Nestle™ milk 5% for 1 h at room temperature and 50 µl of mosquito triturate suspension per well were added for 2 h at room temperature. After incubation, the plates were washed three times with PBS-T and incubated for 1 h at room temperature with 50 µl of peroxidase complex (Kierkegaard & Perry Laboratories Inc.). Following incubation, the plates were washed three times with PBS-T and 100 µl per well of ABTS [2,2'-azino-di(3-ethyl-benzthiazoline sulphonate)-peroxidase substrate solution] (Kierkegaard & Perry Laboratories Inc.) was added. The optical density (OD) was read at 405 nm in a 230S Organon Teknika™ plate reader. For each plate tested, eight adult male *Culex* spp were processed by indirect ELISA and their mean OD plus three standard deviations was taken as a cut-off value to determine positive reactions. All positive samples were retested by indirect ELISA to confirm the results.

Sample size

We adopted a mathematical model proposed by Armitage et al. (2002) to determine the minimum sample size with a precision of 5% to estimate a proportion of blood-meal. It was $n^* = P.Q/(d/1.96)^2$ where: n^* = minimum sample size; P = previous value of the proportion to be estimated; $Q = 1 - P$; $P.Q$ = variance of the parameter in the population; d = standard error which represents the precision of the estimate; 1.96 = 95% confidence level representing the probability of containing the real parameter of the population. Considering $P.Q = 0.25$ that represents the greatest value of variance for the precision selected and $d = 5\%$ that indicates the estimative can deviate from the real parameter at maximum 5%; thus the minimum sample size suitable for inferences from proportions is 384 engorged females.

Statistical analyses

Dependent variables (Dv) considered were: 1 – proportion of blood-meal (P_{BM}) in human; 2 – P_{BM} in dog; 3 – P_{BM} in chicken; 4 – P_{BM} in rat; 5 - multiple host-feeding. Independent variables (Iv) considered were: 1 – area of adult sampling; 2 – Sella's stage; 3 - season of adult sampling. Iv-3 contains the months of adult sampling arranged into groups of seasons of the year. Distributions of Dv-1, Dv-2, Dv-3, and Dv-4 were analyzed on Iv-1 and on Iv-2 by means of the chi-square test to determine likelihood ratio. Distribution of Dv-5 was analyzed on Iv-3 using the chi-square test.

Human Blood Index (HBI)

We used the unweighted HBI which represents the proportion of engorged females blood-fed on humans by the engorged females blood-fed on all hosts.

Feeding Index

We used the feeding index defined by Kay et al. (1979) as the proportion of mosquitoes that fed on one host with respect to another host, divided by the expected proportion of mosquitoes that fed on these two hosts, based on the presence of the hosts in the area of mosquitoes sampling during the hematophagic period.

RESULTS

As shown in Table 1, the proportion of human, dog, chicken and rat bloods in *Cx. quinquefasciatus* were, respectively, 6.5%, 18.8%, 7.4% and 2.8%. There is no statistically significant association between human, chicken, and rat bloods and the collection areas. The values were $X^2 = 5.301$, $p = 0.151$; $X^2 = 6.574$, $p = 0.087$; $X^2 = 6.406$, $p = 0.093$, respectively. Dog blood was distributed in the areas with statistically significant association ($X^2 = 28.537$, $p = 0.000$). The HBI was 0.20 for *Cx. quinquefasciatus* population at the PET.

Table I – Distribution of absolute (n) and relative (%) numbers of *Cx. quinquefasciatus* engorged females tested by ELISA technique according to area of adult sampling and host-feeding habit, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, from June/2005 to May/2006.

| Host ^a Area | Human P n(%); N n(%) | Dog P n(%); N n(%) | Chicken P n(%); N n(%) | Rat P n(%); N n(%) | Total P+N N |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1 | 6(10.0);54(90.0) | 3(5.0);57(95.0) | 4(7.7);56(92.3) | 0(0.0);60(100.0) | 60 |
| 2 | 0(0.0);20(100.0) | 6(30.0);14(70.0) | 0(0.0);20(100.0) | 2(10.0);18(90.0) | 20 |
| 3 | 11(5.0);208(95.0) | 30(13.7);189(86.3) | 13(5.9);206(94.1) | 5(2.3);214(97.7) | 219 |
| 4 | 11(8.4);120(91.6) | 42(32.1);89(67.9) | 15(11.5);116(88.5) | 5(3.8);126(96.2) | 131 |
| Total | 28(6.5);402(93.5) | 81(18.8);349(81.2) | 32(7.4);398(92.6) | 12(2.8);418(97.2) | 430 |

^a P: Positive Blood-meal; N: Negative Blood-meal.

Percentages of human, dog, chicken, and rat bloods in *Cx. nigripalpus* were, respectively, 8.3%, 27.7%, 2.3% and 9.0% (Table 2). Human, dog, chicken, and rat bloods were distributed in the areas with statistically significant association, respectively ($X^2 = 12.602$, $p = 0.006$; $X^2 = 99.326$, $p = 0.000$; $X^2 = 22.096$, $p = 0.000$; $X^2 = 8.271$, $p = 0.041$). The HBI was 0.17 for *Cx. nigripalpus* population at the PET.

The magnitude of the presence of hosts at the PET (Table 3) was used to estimate the expected comparative proportion of mosquitoes feeding on human (7)/dog (7), human (7)/chicken (5), and human (7)/rat (8) that were, respectively, 1.00, 1.40, and 0.88. Thus, rat blood was expected to be in blood-fed mosquito more than human, dog, and chicken bloods.

Human, dog, chicken, and rat bloods were found, respectively, in 28, 81, 32, and 12 blood-fed *Cx. quinquefasciatus* and 147, 488, 41, and 159 blood-fed *Cx. nigripalpus*. The feeding index values were calculated using the proportion of blood-fed mosquitoes on human/dog, human/chicken, and human/rat, divided by, respectively, 1.00, 1.40, and 0.88 (Table 4).

Chicken blood was distributed on Sella's stages of *Cx. nigripalpus* without statistically significant association ($X^2 = 2.437$, $p = 0.296$), and human, dog, and rat bloods were distributed on Sella's stages of this species with statistically significant association, respectively ($X^2 = 15.889$, $p = 0.000$; $X^2 = 74.764$, $p = 0.000$; $X^2 = 57.991$, $p = 0.000$) in Table 5.

Table II – Distribution of absolute (n) and relative (%) numbers of *Cx. nigripalpus* engorged females tested by ELISA technique according to area of adult sampling and host-feeding habit, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, from June/2005 to May/2006.

| Host ^a Area | Human <i>P</i> n(%); <i>N</i> n(%) | Dog <i>P</i> n(%); <i>N</i> n(%) | Chicken <i>P</i> n(%); <i>N</i> n(%) | Rat <i>P</i> n(%); <i>N</i> n(%) | Total <i>P+N</i> <i>N</i> |
|---------------------------|--|--|--|--|---------------------------------|
| 1 | 5(2.9);167(97.1) | 5(2.9);167(97.1) | 6(3.5);166(96.5) | 7(4.1);165(95.9) | 172 |
| 2 | 135(9.3);1324(90.7) | 462(31.7);997(68.3) | 23(1.6);1436(98.4) | 139(9.5);1320(90.5) | 1459 |
| 3 | 5(4.6);104(95.4) | 15(13.8);94(86.2) | 8(7.3);101(92.7) | 9(8.3);109(91.7) | 109 |
| 4 | 2(8.3);22(91.7) | 6(25.0);18(75.0) | 4(16.7);20(83.3) | 4(16.7);20(83.3) | 24 |
| Total | 147(8.3);1617(91.7) | 488(27.7);1276(72.3) | 41(2.3);1723(97.7) | 159(9.0);1605(91.0) | 1764 |

^a *P*: Positive Blood-meal; *N*: Negative Blood-meal

Table III– Distribution of presence of the hosts according to area of adult sampling and host, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, from June/2005 to May/2006.

| Host ^a Area | Human | Dog | Chicken | Rat |
|---------------------------|-------|-----|---------|-----|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 3 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 4 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Total^b | 7 | 7 | 5 | 8 |

^a 1: absence of the host in the area; 2: presence of the host in the area.

^b Magnitude of presence of the host at the PET.

Table IV – Distribution of feeding index according to species, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, from June/2005 to May/2006.

| Feeding Index | Human/Dog | Human/Chicken | Human/Rat |
|-----------------------------|-----------|---------------|-----------|
| Species | | | |
| <i>Cx. quinquefasciatus</i> | 0.35 | 0.63 | 2.65 |
| <i>Cx. nigripalpus</i> | 0.30 | 2.56 | 1.05 |

Table V—Distribution of absolute (n) and relative (%) numbers of *Cx. nigripalpus* engorged females tested by ELISA technique according to Sella's stage and host-feeding habit, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, from December/2005 to May/2006.

| Host ^a Sella | Human P n(%); N n(%) | Dog P n(%); N n(%) | Chicken P n(%); N n(%) | Rat P n(%); N n(%) | Total P+N N |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------|
| IB _m ^b | 25(5.0);471(95.0) | 68(13.7);428(86.3) | 13(2.6);483(97.4) | 15(3.0);481(97.0) | 496 |
| 2 | 64(11.8);477(88.2) | 194(35.9);347(64.1) | 7(1.3);534(98.7) | 87(16.1);454(83.9) | 541 |
| 3-6 | 4(7.3);51(92.7) | 7(12.7);48(87.3) | 1(1.8);54(98.2) | 2(3.6);53(96.4) | 55 |
| Total | 93(8.5);999(91.5) | 269(24.6);823(75.4) | 21(1.9);1071(98.1) | 104(9.5);988(90.5) | 1092 |

^a IB_m: Incomplete blood-meal.

^b P = Positive Blood-meal; N = Negative Blood-meal.

Cx. quinquefasciatus and *Cx. nigripalpus* populations had 3.2% and 8.2% multiple host-feedings, respectively. The multiple host-feeding of *Cx. quinquefasciatus* and of *Cx. nigripalpus* populations had no statistically significant associations with the seasonality, respectively ($X^2 = 4.030$; $p = 0.630$; $X^2 = 9.123$; $p = 0.167$).

DISCUSSION

The sum of proportions of blood-fed females in human (6.5%), dog (18.8%), chicken (7.4%), and rat (2.8%) subtracted by multiple host-feeding (3.2%) in *Cx. quinquefasciatus* female population is 32.3%, which is the proportion of blood-meal identified in this study. Consequently, the tests failed to identify 67.7% of the engorged females tested for human, dog, rat, and chicken blood. The results indicate that *Cx. quinquefasciatus* females may have taken another source of blood that was not tested. Furthermore, it would be necessary to test IgG antisera for birds and other mammals to complete the identification of blood sources for *Cx. quinquefasciatus* in PET.

It is noteworthy that in the area, *Cx. quinquefasciatus* showed a zoophilic behavior, which may be a sample bias. We believe that the zoophilic behavior may be related to an absence of indoors collections and also because most blood-fed females were captured in the open areas in the PET where there are diverse sources of wild animals either kept free or in captivity.

Furthermore, *Cx. quinquefasciatus*, incriminated as a vector of *Dirofilaria immitis* in Brazil, was found to feed on dogs in Areas 2 and 4 and thus has the potential to be involved in the dynamics of the transmission of that parasite in the PET.

The sum of proportions of blood-meal in human (8.3%), dog (27.7%), chicken (2.3%), and rat (9.0%) subtracted by multiple host-feeding (8.2%) in *Cx. nigripalpus* female population is 39.1%, the proportion of blood-meals identified in this study. Thus, there were 60.9% of unidentified blood-meals, indicating the need for IgG antisera for birds and other mammals to complete identification of the hosts in the unidentified samples. *Cx. nigripalpus* showed zoophilic behavior in the PET areas sampled in this study. Furthermore, the number of *Cx. nigripalpus* blood-fed females collected in Area 2 is noteworthy.

The HBI values for *Cx. quinquefasciatus* (0.20) and *Cx. nigripalpus* (0.17) indicated low antropophilic behavior of these species. However, we assume that the absence of indoor collections may influence this result. The feeding index values for *Cx. quinquefasciatus* (human/dog = 0.35, human/chicken = 0.63, human/rat = 2.65) indicate that dogs and chickens are important hosts, whereas rats are not. The feeding index values for *Cx. nigripalpus* (human/dog = 0.30, human/chicken = 2.56, human/rat = 1.05) indicate that dog is an important host, human and rat are less important hosts, and chicken is not an important host.

Cross-reactions might have occurred in this research, for example, New World monkey blood may have cross-reacted with human IgG, crab-eating fox's blood may have cross-reacted with dog IgG, and a taxonomically related host's blood might have reacted with chicken IgG. Rat IgG, however, is not supposed to have cross-reacted with any other host blood.

Human, dog, and rat bloods had statistically significant associations on Sella's stages of *Cx. nigripalpus*. In conclusion, we hypothesized that mosquito samples in Sella 2 stage are the most appropriate for testing blood-feeding patterns, primarily because the highest sensibility was detected in those samples in Sella 2 stage.

The proportion of incomplete blood-meals and proportion of multiple host-feeding are parameters of a *Cx. nigripalpus* population and indicate the proportion of two or more blood-feedings in the same gonotrophic cycle involving two or more hosts. An incomplete blood-feeding occurs because the host becomes irritated by the mosquitoes' biting activity, and, thus, the mosquito must seek another host to fill her abdomen with blood. The season did not affect the multiple host-feeding, and that fact increases the epidemiological importance of this species. Finally, *Cx. nigripalpus* had a great proportion of incomplete blood-feedings and more multiple host-feedings than *Cx. quinquefasciatus*, indicating it is an efficient haematophagous insect in the PET, independent of the season.

Acknowledgements

This investigation received financial support from the FAPESP (Grant 05/53973-0), UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) (Grant A50252), and CNPq (Grant 472485/2006-7).

REFERENCES

- Ahid, S.M.M., Lourenço-de-Oliveira, R., Saraiva, L.Q.; 1999. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. *Cad. Saude Publ.* 15, 405-412.
- Akey, B.L., Nayar, J.K., Forrester, D.J., Meyer, R.P., Hardy, J.L., Presser, S.B.; 1983. Comparative vector competence of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* from the coachella, imperial, and San Joaquin Valleys of California for St. Louis encephalitis virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 305-11.
- Alves, L.C., Cole, E.F., Athayde, A.C.R.; 1993. Prevalência da filariose canina no bairro de Dois Irmãos, Recife, PE. *Rev. Bras. Parasitol.* 2, 68.
- Anderson, R.A., Brust, R.A.; 1995. Field evidence for multiple host contacts during blood feeding by *Culex tarsalis*, *Cx. restuans* and *Cx. nigripalpus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 32, 705-710.
- Armitage, P., Berry, G., Matthews, J.N.S.; 2002. *Statistical methods in medical research*, 4th ed., Blackwell Science, Massachusetts, USA, xxii + 817 pp.

- Barbosa, V.K.C., Cardoso, G.H.M.; 2005. Estudo Preliminar da Avifauna Aquática do Parque Ecológico do Tietê. São Paulo. Available on: <http://www.spzoo.org.br>. Accessed in: 13 March 2007.
- Beier, J., Odago, W.O., Onyango, F.K., Asiago, C.M., Koech, D.K., Roberts, C.R.; 1990. Relative abundance and blood feeding behavior of nocturnally active culicine mosquitoes in western Kenya. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6, 207-12.
- Beier, J.C., Perkins, P.V., Wirtz, R.A., Koros, J., Diggs, D., Gargan II, T.P., Koech, D.K.; 1988. Bloodmeal identification by direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.* 25, 9-16.
- Brito, A.C., Williams, P., Fontes, G., Rocha, E.M.; 1997. A comparison of two Brazilian populations of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) from endemic and non-endemic areas to infection with *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92,33-6.
- Chow, E., Wirtz, R.A., Scott, T.W.; 1993. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9, 196-205.
- Ecotiete; 2007. Histórico e projeto de criação do Parque Ecológico do Tietê. São Paulo. Available on: <http://www.ecotiete.sites.uol.com.br>. Accessed in: 13 March 2007.
- Edman, J.D., Webber, L.A.; 1975. Effect of vertebrate size and density on host-selection by caged *Culex nigripalpus*. *Mosq. News.* 35, 508-512.

- Forattini, O.P., Gomes, A.C., Natal, D., Kakitani, I., Marucci, D.; 1987. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 21, 171-187.
- Forattini, O.P.; 2002. *Culicidologia médica*, 2nd vol., São Paulo, EDUSP, xxii + 859p.
- Garrett-Jones, C.; 1964. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 30, 241-261.
- Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K., Scott, T.W.; 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1385-1391.
- Gomes, A.C., Silva, N.N., Marques, G.R.A.M., Brito, M.; 2003. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of Sao Paulo, Brazil. *J. Vector Ecol.* 28, 74-78.
- Guimarães, A.E., Arlé, M., Machado, R.N.M.; 1985. Mosquitos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. IV Preferência alimentar. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82, 277-285.
- Kay, B.H., Boreham, P.F.L., Edman, J.D.; 1979. Application of the feeding index concept to studies of mosquito host-feeding patterns. *Mosq. News.* 39, 68-72.
- Labarthe, N.V.; 1997. *Dirofilariose canina: diagnóstico, prevenção e tratamento aduicida. Revisão de Literatura.* *Clin. Vet.* 10, 10-16.
- Labarthe, N.V., Serrão, M.L., Melo, Y.F., Oliveira, S.J., Lourenço-Oliveira, R.; 1998. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine

- dirofilariasis area in Niteroi, State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93, 145-154.
- Laporta, G.Z., Natal, D., Urbinatti, P.R.; 2006. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. Rev. Bras. Entomol. 50, 125-127.
- Mendez, W., Liria, J., Navarro, J.C., Garcia, C.Z., Freier, J.E., Salas, R., Weaver, S.C., Barrera, R.; 2001. Spatial dispersion of adult mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a sylvatic focus of Venezuelan Equine Encephalites Virus. J. Med. Entomol. 38, 813-821.
- Niebylski, M.L., Meek, C.I.; 1992. Blood feeding of *Culex* mosquitoes in an urban environment. Am. J. Mosq. Control Assoc. 8, 173-177.
- Pereira, L.E., Suzuki, A., Coimbra, T.L.M., Souza, R.P., Chamelet, E.L.B.; 2001. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). Rev. Saúde Públ. 35, 119-123.
- Reisen, W.K., Meyer, R.P., Tempelis, C.H., Spoehel, J.J.; 1990. Mosquito abundance and bionomics in residential communities in Orange and Los Angeles counties, California. J. Med. Entomol. 27, 356 – 357.
- Samuel, P.P., Arunachalam, N., Hiriyan, J., Thenmozhy, V., Gajanana, A., Satyanarayana, K.; 2004. Host-feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* Say and *Mansonia annulifera* Theobald (Diptera: Culicidae), the major vector of Filariasis in a rural area of south Índia. J. Med. Entomol. 41, 442-446.

- Sardelis, M.R., Turell, M.J., Dohm, D.J., O'guinn, M.L.; 2001. Vector competence of selected north american *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 1018-1022.
- Sudia, W.D., Chamberlain, R.W.; 1964. Experimental infection of *Culex nigripalpus* Theobald with the virus of St. Louis encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 469-71.
- Taipe-Lagos, C.B., Natal, D.; 2003. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. *Rev. Saúde Públ.* 37, 275-279.
- Urbinnati, P.R., Sendacz, S., Natal, D.; 2001. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. *Rev. Saúde Públ.* 35, 461-466.
- Zinser, M., Ramberg, F., Willott, E.; 2004. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potencial West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both human and birds. *J. Insect Science.* 4, 20. Available on line: insectscience.org/4.20. Accessed 18 February 2006.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No manuscrito número 1, os experimentos indicaram uma densidade de, aproximadamente, 3 mosquitos por m² e uma taxa de sobrevivência de 0,86 por dia, ou seja, de cada 100 fêmeas, 86 sobrevivem pelo menos um dia. Acrescenta-se que esses resultados eram esperados porque essa população de *Cx. quinquefasciatus* prolifera intensamente no canal poluído e causa incômodo às pessoas moradoras nas margens desse canal. A presença dessa espécie indica essa área como insalubre e, portanto, conclui-se que a população de *Cx. quinquefasciatus* que prolifera no PET deveria ser um dos alvos do programa de controle de vetores na cidade de São Paulo.

No manuscrito número 2, o método de ELISA indireto foi padronizado para *Cx. nigripalpus* e de *Cx. quinquefasciatus* que tiveram hábito alimentar zoofílico. Esse resultado não era esperado para *Cx. quinquefasciatus* porque essa espécie é antropofílica, entretanto, admite-se um viés pela ausência de coletas no intradomicílio. Ressalta-se que a frequência de fêmeas ingurgitadas de *Cx. nigripalpus* e de *Cx. quinquefasciatus* com repasto incompleto indica o potencial de transmissão de agentes patogênicos. Acrescenta-se que a detecção do sangue do hospedeiro em fêmeas dessas espécies em estágio de Sella 2 foi maior com significância estatística.

A metodologia empregada nessa pesquisa é para a estimativa da densidade, da sobrevivência e da proporção de repastos sanguíneos em humanos. Esses parâmetros são importantes para a estimativa da capacidade vetora. Entretanto, o modelo da capacidade vetora é inadequado para áreas onde não há transmissão indireta de doenças. Ressalta-se a importância de desenvolvimento de um modelo matemático que indique um índice de infestação por mosquitos antropofílicos para ser aplicado no monitoramento e controle de populações de vetores biológicos e pragas urbanas.

6 REFERÊNCIAS

1. Ahid SMM, Lourenço-de-Oliveira R, Saraiva LQ. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. *Cad Saúde Pública*. 1999;15:405-412.
2. Ahid SMM, Vasconcelos PSS, Oliveira RL. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95: 769-775.
3. Akey BL, Nayar JK, Forrester DJ, Meyer RP, Hardy JL, Presser SB. Comparative vector competence of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* from the coachella, imperial, and San Joaquin Valleys of California for St. Louis encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1983; 32: 305-11.
4. Alphey L, Andreasen M. Dominant lethality and insect population control. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002; 121: 173–178.
5. Alves LC, Cole EF, Athayde ACR. Prevalência da filariose canina no bairro de Dois Irmãos, Recife, PE. *Rev Bras Parasitol*. 1993; 2: 68.
6. Anderson RA, Brust RA. Field evidence for multiple host contacts during blood feeding by *Culex tarsalis*, *Cx. restuans* and *Cx. nigripalpus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1995; 32: 705-710.
7. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. *Statistical methods in medical research*. 4th ed., Massachusetts: Blackwell Science; 2002.
8. Bailey NTJ. Improvements in the interpretation of recapture data. *J Animal Ecol*. 1952; 21: 120-127.
9. Barbosa VKC, Cardoso GHM. Estudo Preliminar da Avifauna Aquática do Parque Ecológico do Tietê. In: *Anais XIV Congresso da Sociedade Paulista de Zoológicos* [evento na internet]; 2005; São Paulo, BR. São Paulo [acesso em 13 Mar 2007]. Disponível em: <http://www.spzoo.org.br>.

10. Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan II TP, Koech DK. Bloodmeal identification by direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), tested on Anopheles (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol.* 1988; 25: 9-16.
11. Beier J, Odago WO, Onyango FK, Asiago CM, Koech DK, Roberts CR. Relative abundance and blood feeding behavior of nocturnally active culicine mosquitoes in western Kenya. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990; 6: 207-12.
12. Bracco JE, Dalbon M, Marinotti O, Barata JMS. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. *Rev Saúde Pública.* 1997; 31: 182-183.
13. Brito AC, Williams P, Fontes G, Rocha EM. A comparison of two Brazilian populations of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) from endemic and non-endemic areas to infection with *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92:33-6.
14. Burkot TR, Goodman WG, Defoliart GR. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30: 1336-1341.
15. Calheiros CML. Transmissores em potencial e naturalmente infectados pela *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) em Maceió – Alagoas [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG; 1996.
16. CDC - Center of Disease Control. Outbreak of West Nile-Like Viral Encephalitis -- New York, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 1999; 48: 845-849.
17. Charlwood JD. Estudos sobre a biologia e hábitos alimentares de *Culex quinquefasciatus* Say de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica.* 1979; 9: 271-278.
18. Charlwood JD, Rafael JA, Wilkes TJ. Métodos de determinar a idade fisiológica em Diptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. *Acta Amazonica.* 1980; 10: 311–333.

19. Chow E, Wirtz RA, Scott TW. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Am Mosq Control Assoc.* 1993; 9: 196-205.
20. Christophers SR. The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism.* 1911; 2: 73-89.
21. Consoli RAGB, Lourenço-de-oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1998. *Biologia e morfologia interna*; p228.
22. Davidson G. Estimation of the survival-rate of Anopheline mosquitoes in nature. *Nature.* 1954; 174: 792-793.
23. De Meillon B. Cane-sugar feeding in *Culex pipiens fatigans*. *Bull Wild Hlth Org.* 1967; 36: 67-73.
24. Detinova TS. Physiological changes in the ovaries of female *Anopheles maculipennis*. *Med Parasitol.* 1949; 18: 410-420.
25. Dixit V, Gupta AK, Kataria OM, Prasad GB. Host preference of *Culex quinquefasciatus* in Raipur city of Chattisgarh state. *J Commun Dis.* 2001; 33: 17-22.
26. Ecotiete [homepage na internet]. São Paulo: Histórico e projeto de criação do Parque Ecológico do Tietê [acesso em 6 fevereiro 2007]. Disponível em: <http://www.ecotiete.sites.uol.com.br>.
27. Edman JD, Webber LA, Schmid AA. Effect of host defenses on the feeding pattern of *Culex nigripalpus* when offered a choice of blood sources. *J Parasitol.* 1974; 60:874-883.
28. Edman JD, Webber LA. Effect of vertebrate size and density on host-selection by caged *Culex nigripalpus*. *Mosq News.* 1975; 35: 508-512.

29. Elizondo-Quiroga A, Flores-Suarez A, Elizondo-Quiroga D, Ponce-Garcia G, Blitvich BJ, Contreras-Cordero JF, Gonzalez-Rojas JI, Mercado-Hernandez R, Beaty BJ, Fernandez-Salas I. Gonotrophic cycle and survivorship of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using sticky ovitraps in Monterrey, Northeastern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006; 22: 10-14.
30. Flores-Mendoza C, Cunha RA, Rocha DS, Lourenco-de-Oliveira R. Identification of food sources of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) by precipitin test in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saude Publica.* 1996; 30: 129-34.
31. Forattini OP, Ishiata GK, Rabello EX, Cotrim MD. Observação sobre os mosquitos *Culex* da cidade de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1973; 7: 315-330.
32. Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Kakitani I, Marucci D. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1987; 21: 171-187.
33. Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4-Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. *Rev Saúde Pública.* 1993; 27: 398-411.
34. Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 6 - Breeding in empty conditions of rice fields in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pública.* 1994; 28: 395-399.
35. Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 10- Survey of adult behaviour of *Culex nigripalpus* and other species of *Culex* (*Culex*) in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pública.* 1995; 29: 271-278.
36. Forattini OP, Kakitani I, Santos RC, Kobayashi KM, Ueno HM, Fernández Z. The synanthropic potential of *Kerteszia* and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2000; 34: 565-569.
37. Forattini OP. *Culicidologia médica- volume 2.* São Paulo: EDUSP; 2002.

38. Fox AS, Brust RA. How do dilations form in mosquitoes ovarioles? *Parasitol Today*. 1994; 10: 19-23.
39. García-Réjon JE, Farfan-Alé JA, Loroño-Pino MA, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Chávez-Medina JM, Baak-Baak C, Fernández-Salas I, Blitvich B, Beaty B. The search for West Nile virus in *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) in Merida, Yucatán, México. In: Proceedings of 72. American Mosquito Control Association Annual Meeting; 2006; Detroit, USA.
40. García-Réjon JE, Farfan-Alé JA, Ulloa-García A, Flores-Flores LF, Baak-Baak C, Rosado-Paredes EP, Fernández-Salas I, Beaty B. The gonotrophic cycle length of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) in Merida, Yucatán, México. In: Proceedings of 72. American Mosquito Control Association Annual Meeting; 2006; Detroit, USA.
41. Garrett-Jones C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull Wild Hlth Org*. 1964; 30: 241-261.
42. Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8: 1385-1391.
43. Gomes AC, Silva NN, Marques GRAM, Brito M. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of Sao Paulo, Brazil. *J Vector Ecol*. 2003; 28: 74-78.
44. Guimarães AE, Arlé M, Machado RNM. Mosquitos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. IV Preferência alimentar. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985; 82: 277-285.
45. Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Mello RP. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. III – Daily biting rhythms and lunar cycle influence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95: 753-760.
46. Hill AB. The environment and disease: Association or Causation. *Proceed Royal Soc Med*. 1965; 58: 295-300.

47. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Noções básicas de cartografia. Rio de Janeiro: CDDI; 1999. Representação cartográfica. 130p.
48. Kay BH, Boreham PFL, Edman JD. Application of the feeding index concept to studies of mosquito host-feeding patterns. Mosq. News. 1979; 39: 68-72.
49. Kakitani I, Forattini OP. Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albitarsis* em área de agroecossistema irrigado. Rev Saúde Pública. 2000; 34: 33-38.
50. Labarthe NV. Dirofilariose canina: diagnóstico, prevenção e tratamento adulticida. Revisão de Literatura. Clin Vet. 1997; 10: 10-16.
51. Labarthe N, Serrão ML, Melo YF, Oliveira SJ, Lourenço-Oliveira R. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niteroi, State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 145-154.
52. Laporta GZ, Natal D, Urbinatti PR. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. Rev Bras Entomol. 2006; 50:125-127.
53. Lindquist AW, Ikeshoji T, Grab B, de Meillon B, Khan ZH. Dispersion studies of *Culex pipiens fatigans* tagged with ³²P in the Kemmendine area of Rangoon, Burma. Bull Wild Hlth Org. 1967; 36: 21-37.
54. Macdonald WW, Sebastian A, Tun MM. A mark-release-recapture experiment with *Culex pipiens fatigans* in the village of Okpo, Burma. Ann Trop Med Parasitol. 1968; 62:200-9.
55. Marquetti MC, Ortega NA, Bisset JÁ. Estudio de la actividad hematofagica de *Culex (C.) quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae). Rev Cub Med Trop. 1986; 38, 171-178.

56. Medeiros Z, Dreyer G, Andrade LD, Pires ML, Mendes J, Pimentel R. *Wuchereria bancrofti* microfilarial density of autochthonous cases and natural *Culex* infectivity rates in northeast Brazil. *J Trop Med Hyg.* 1992; 94: 214-217.
57. Mendez W, Liria J, Navarro JC, Garcia CZ, Freier JE, Salas R, Weaver SC, Barrera R. Spatial dispersion of adult mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a sylvatic focus of Venezuelan Equine Encephalites Virus. *J Med Entomol.* 2001; 38: 813-821.
58. Menezes RMT. Aspectos bioecológicos de *Culex quinquefasciatus* e *Ochlerotatus scapularis* abrigados em habitats do Parque Ecológico do Tietê [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2002.
59. Merrit RW, Dadd RH, Walker ED. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Ann Rev Entomol.* 1992; 37: 349-376.
60. Morais SA, Natal D, Marreli MT. Aspectos da distribuição de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say na região do Rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. 2006; 50: 413-418.
61. Natal D, Paganelli CH, Santos JLF. Composição da população adulta de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 em ecótopos próximos à represa Edgard de Souza, no município de Santana do Parnaíba, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Entomol.* 1991; 35: 539-543.
62. Natal D, Barata EAMF, Urbinatti PR, Barata JMS. Contribuição ao conhecimento da fauna de imaturos de mosquitos (Diptera, Culicidae) em área de implantação de hidroelétrica na bacia do Rio Paraná, Brasil. *Ver Bras Entomol.* 1995; 39: 897-899.
63. Natal D, Ueno HM. Vírus Do Nilo Ocidental: Características da transmissão e implicações vetoras. *Entomol y Vector.* 2004; 11: 417-433.
64. Niebylski ML, Meek CI. Blood feeding of *Culex* mosquitoes in an urban environment. *Am J Mosq Control Assoc.* 1992; 8: 173-177.

65. Olejnicek J, Gelbic I. Autogeny in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *J Vec Ecol* 2000; 25: 118-122.
66. Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TLM, Souza RP, Chamelet ELB. Arbovírus Ilhéus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). *Rev Saúde Pública*. 2001; 35(2): 119-123.
67. Polovodova VP. The determination of the physiological age of female Anopheles by the number of gonotrophic cycle completed. *Med Parasitol*. 1949; 18: 352-355.
68. Rajagopalan PK, Yasuno M, Labrecque GC. Dispersal and survival in the field of chemosterilized, irradiated, and cytoplasmically incompatible male *Culex pipiens fatigans*. *Bull Wld Hlth Org*. 1973; 48: 631-5.
69. Reisen WK, Meyer RP, Tempelis CH, Spoehel JJ. Mosquito abundance and bionomics in residential communities in Orange and Los Angeles counties, California. *J Med Entomol*. 1990; 27: 356 – 357.
70. Reisen WK, Milby MM, Meyer RP, Pfuntner AR, Spoehel J, Hazelrigg JE, Webb jr JP. Mark-release-recapture studies with *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southern California. *J Med Entomol*. 1991; 28: 357-371.
71. Reisen WK, Milby MM, Meyer RP. Population dynamics of adult *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) along the Kern river, Kern County, California, in 1992. *J Med Entomol*. 1992; 29(3): 531-543.
72. Reisen WK, Lothrop HD, Lothrop B. Factors influencing the outcome of mark-release-recapture studies with *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2003; 40(6): 821-829.
73. Rocha EMM, Fontes G. Filariose bancroftiana no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1998; 32: 98-105.

74. Samuel PP, Arunachalam N, Hiriyan J, Thenmozhi V, Gajanana A, Satyanarayana K. Host-feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* Say and *Mansonia annulifera* Theobald (Diptera: Culicidae), the major vector of Filariasis in a rural area of south Índia. *J Med Entomol.* 2004; 41: 442-446.

75. Santos OO. Conhecimento atual sobre técnicas de determinação do hábito alimentar de artrópodes vetores [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1990.

76. Santos RC, Forattini OP. Marcação-soltura-recaptura para determinar o tamanho da população de *Anopheles albitarsis* l.s. (Diptera: Culicidae). *Rev Saúde Pública.* 1999; 33: 309-313.

77. Sardelis MR, Turell MJ, Dohm DJ, O'guinn ML. Vector competence of selected north american *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile Vírus. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 1018-1022.

78. Schreiber ET, Mulla MS, Chaney JD, Dhillon MS. Dispersal of *Culex quinquefasciatus* from a dairy in southern California. *J Am Mosq Control Assoc.* 1988; 4: 300-4.

79. Schubert JH, Holdeman LV. A modified precipitin technique for determining the source of mosquito blood-meals. *Am J Trop Med Hyg.* 1956; 5: 272-3.

80. Sella M. Relazione della campagna anti-anofelica di Flumicino (1919) con speciale riguardo alla biologia degli Anofelied agli Anofeli infetti. *Ann Igiene.* 1920; 30.

81. Service MW, Voller A, Bidwell DE. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of blood-meals of haematophagous insects. *Bull Entomol Res.* 1986; 76:321-330.

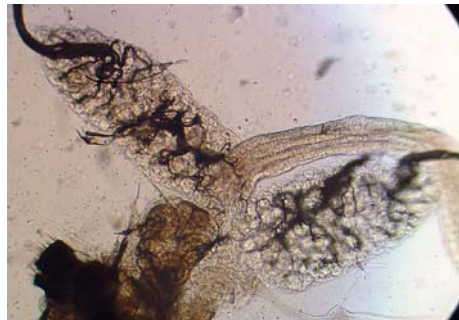
82. Sokolova MI. A redescription of the morphology of mosquito (Diptera: Culicidae) ovaríolos during vitellogenesis. *Bull Soc Vec Ecol.* 1994; 19: 53-68.

83. Soubihe V. Estudos de populações de mosquitos no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biológicas da USP; 1994.
84. Stein M, Oria GI, Almirón WR. Principales criaderos para *Aedes aegypti* y culicídeos asociados, Argentina. Rev de Saúde Pública. 2002; 36: 627-630.
85. Sudia WD, Chamberlain RW. Experimental infection of *Culex nigripalpus* Theobald with the virus of St. Louis encephalitis. Am J Trop Med Hyg. 1964; 13: 469-71.
86. Taipe-lagos CB. Ecologia de culicídeos em área protegida inserida no ecossistema urbano, 1996-1998, Guarulhos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2000.
87. Taipe-lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. Rev Saúde Pública. 2003; 37(3): 275-279.
88. Tempelis CH, Lofy MF. A modified precipitin method for identification of mosquito bloodmeals. Am J Trop Med Hyg. 1963; 12: 825-31.
89. Urbinatti PR. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae): caracterização de criadouros – Parque Ecológico do Tietê, Guarulhos, SP [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2000.
90. Urbinatti PR, Sendacz S, Natal D. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. Rev Saúde Pública. 2001; 35(5): 461-466.
91. Vythilingam I, Oda K, Mahadevan S, Abdullah G, Thim CS, Hong CC, Vijayamalar B, Sinniah M, Igarashi A. Abundance, parity, and Japanese encephalitis virus infection of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Sepang District, Malaysia. J Med Entomol. 1997; 34: 257-62.
92. White GB. Geographical Distribution of Arthropod-borne Diseases and their Principal Vectors. Geneva: World Health Organization; 1989. Lymphatic filariasis, p. 23-34.

93. Zinser M, Ramberg F, Willott E. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both human and birds. *J Insect Science* [periódico na internet]. 2004 [Acesso em 18 Fevereiro 2006]; 4:[3 screens]. Disponível em: <http://www.insectscience.org/papers/>.

ANEXO

Anexo 1 – Imagens dos ovários de *Cx. quinquefasciatus*



(100x)

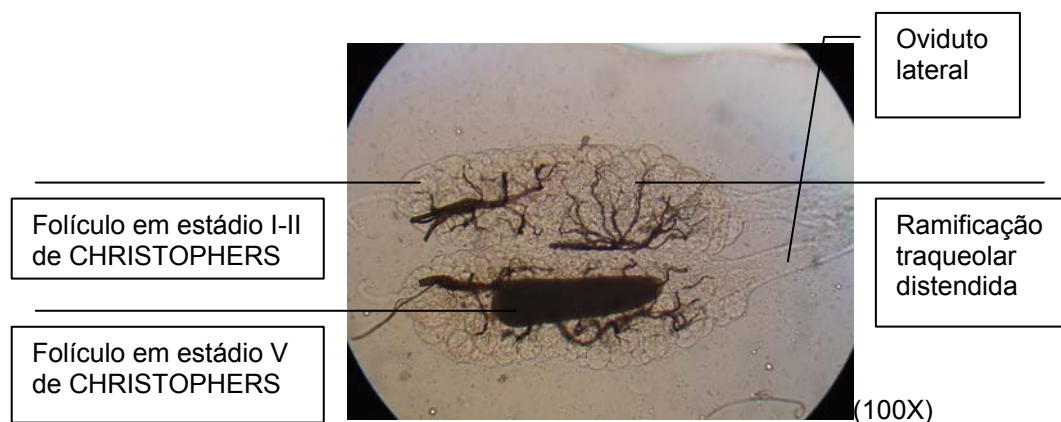
FIGURA 1 – Imagem de ovários de *Cx. quinquefasciatus*.



(25x)

Folículo em estágio V
de CHRISTOPHERS

FIGURA 2 – Imagem de ovários de *Cx. quinquefasciatus*.



(100X)

FIGURA3 – Imagem de ovários de *Cx. quinquefasciatus*.

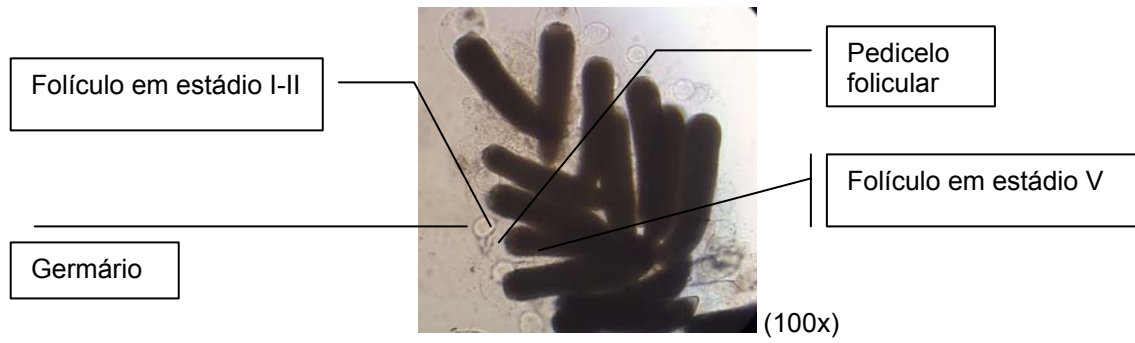


FIGURA 4– Imagem de ovário de *Cx. quinquefasciatus*.

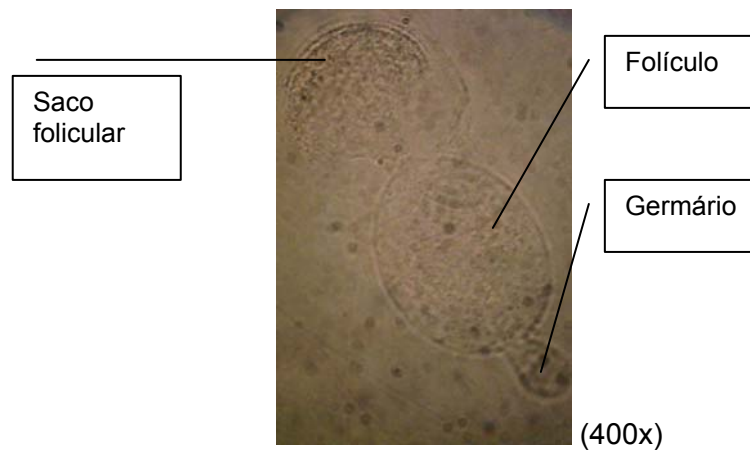


FIGURA 5– Imagem de ovariolo de *Cx. quinquefasciatus*.

Anexo 2 – Local de estudo - Parque Ecológico do Tietê

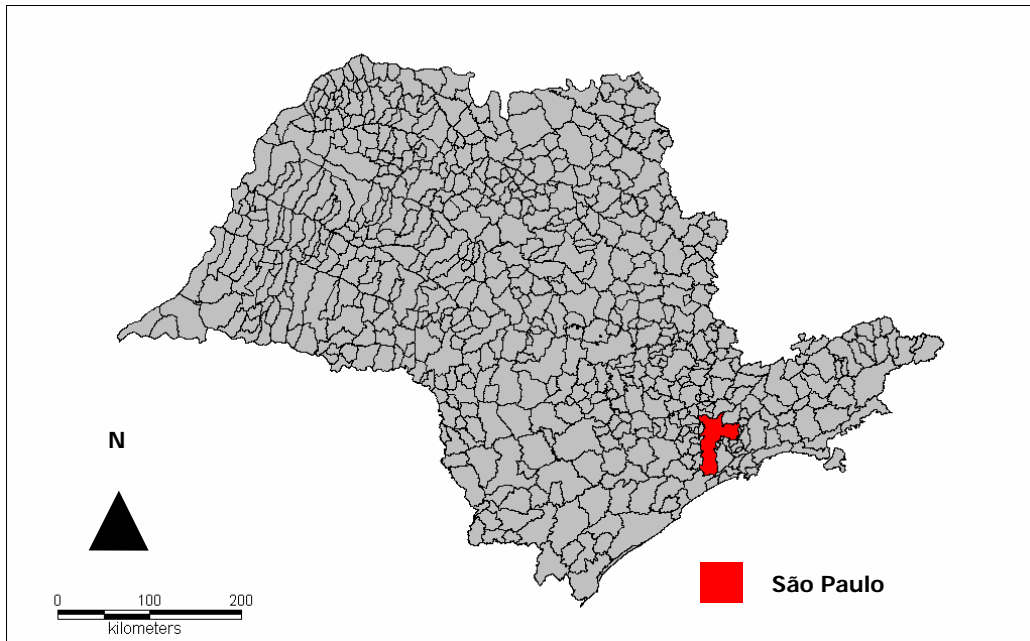


FIGURA 1– Mapa do estado de São Paulo.

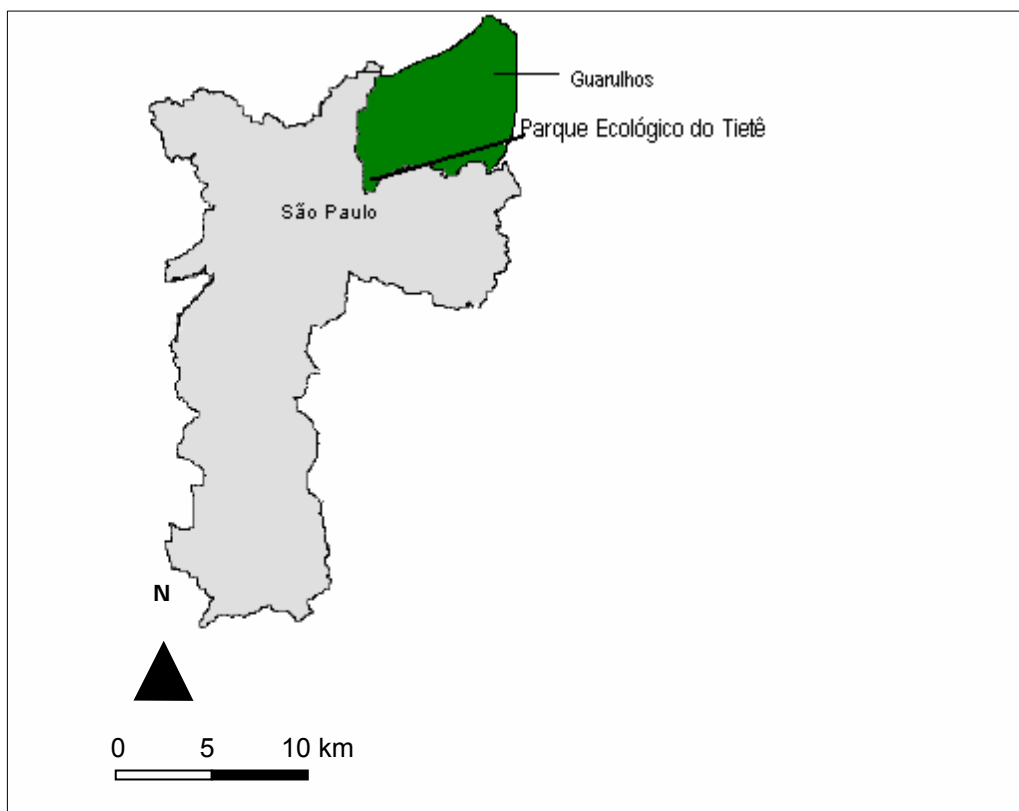


FIGURA 2– Mapa das cidades de São Paulo e de Guarulhos.



FIGURA 3— Carta geográfica e imagens com as áreas de coleta 1, 2, 3 e 4 no Parque Ecológico do Tietê.

Anexo 3 – Áreas de coleta



FIGURA 1 - ÁREA 1: Mata residual com eucaliptos.

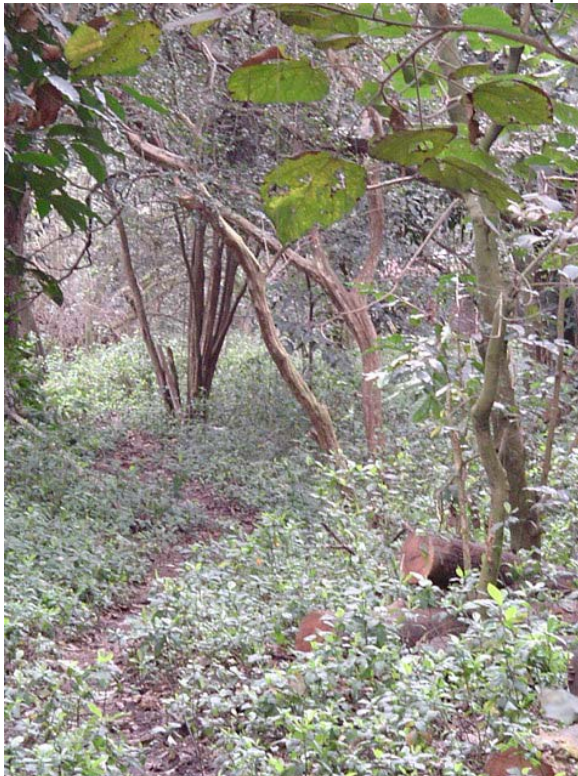


FIGURA 2 -ÁREA 2: Mata residual próxima ao biotério.



FIGURA 3 – ÁREA 3: Área aberta próxima à administração do PET.



FIGURA 4 - ÁREA 4: Canal de circunvalação denominado rio Negrinho.

Anexo 4 – Experimentos



FIGURA 1 – Imagem aérea da área de estudo



FIGURA 2 – Teste preliminar de sobrevivência



FIGURA 3 – Coleta de imaturos.



FIGURA 6 – Soltura de fêmeas.



FIGURA 4 – Coleta de adultos.



FIGURA 7 – Recaptura de fêmeas.



FIGURA 5 – Marcação de fêmeas.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)