Identificação de fonte sangüínea em dípteros da Família Culicidae, em áreas de epizootia da febre amarela silvestre.

ANA MARIA MARASSÁ

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

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: EPIDEMIOLOGIA

ORIENTADOR: PROF. DR. ALMÉRIO DE CASTRO GOMES

SÃO PAULO

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus queridos,

José, Ana Maria

Fernando e Ana Paula

“A verdadeira viagem do descobrimento

não consiste em procurar novas paisagens,

mas em ver com novos olhos”

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

À DEUS por todos os momentos.

Ao Prof. Dr. ALMÉRIO DE CASTRO GOMES, pela orientação e confiança depositada.

Às amigas, CLEIDE ASCHENBRENNER CONSALES, Pesquisador Científico do Instituto Pasteur, pela colaboração no teste imunoenzimático, MARIA DULCE BIANCHI ROSA, MARCIA BICUDO DE PAULA, MÁRCIA FONSECA de CASTRO GUTIERREZ de SOUZA, ROSA MARIA MARQUES de SÁ e ARISTIDES FERNANDES da Faculdade de Saúde Pública/USP pela amizade, colaboração e incentivo.

À SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE projeto no. 25000.022.005/2004-56 SIPAR/MS pelo fornecimento dos reagentes utilizados nessa pesquisa.

AO CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/SECRETARIA DE SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL (CEVS), PREFEITURAS DOS MUNICÍPIOS DE SANTO ANTONIO DAS MISSÕES E GARRUCHOS, RS, À MARIA AMÉLIA NASCIMENTO TORRES, médica veterinária da Secretaria de Saúde/RS e EQUIPE DE CAMPO pela colaboração na obtenção das amostras.

AO CENTRO DE EDUCAÇÃO PERMANENTE (CEAP/USP), em nome de JANAÍNA DE CAMARGO COSTA pelo auxílio na compra do material, ANA PAULA MARASSÁ pelo tratamento das fotos e RODRIGO SPORTELO (INFORMÁTICA/FSP/USP) com as figuras.

AO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, pela permissão deste trabalho.

RESUMO

A importância em conhecer o padrão alimentar em mosquitos da Família Culicidae permite esclarecer alguns aspectos relacionados à transmissão de zoonoses e estimar o grau de contato humano-vetor que é fator relevante em estudos epidemiológicos. Com o objetivo de explorar o comportamento alimentar dessa Família, em área epizoótica de febre amarela silvestre, foram coletados exemplares nos municípios de Santo Antônio das Missões e Garruchos, Estado do Rio Grande do Sul. Fêmeas ingurgitadas foram obtidas por aspiração em ambiente de mata, no período de setembro de 2005 a abril de 2007 e identificadas segundo fonte de sangue ingerido através da técnica imunoenzimática ELISA de captura no sistema avidina-biotina. Foram testadas seis fontes de alimento: ave, bovino, eqüino, humano, macaco e rato. Os resultados obtidos mediante a padronização de anticorpos monoclonais possibilitaram demonstrar pela primeira vez o reconhecimento de sangue humano ingerido nesses mosquitos pelo emprego da subclasse IgG1 e comprovar a sensibilidade e especificidade da técnica ELISA de captura. No município de Santo Antônio das Missões, de um total de 190 amostras, 60,9% reagiram para sangue de boi, 23,6% para humano, 9,9% para ave, 1,9% para macaco e 3,7% para combinações de dois hospedeiros. Quanto às amostras referentes ao município de Garruchos, das 158 fêmeas capturadas na área Cachoeirinha pode-se observar reatividade para ave (16%), boi (29,6%), humano (36,8%), cavalo (4%), macaco (0,8%) e combinações de hospedeiros (12,8%), enquanto que para as 149 fêmeas pertencentes à área de São José, detectou-se sangue ingerido de boi em (51,5%), ave e humano (11,5%), macaco (6,2%), cavalo (0,8%) e mistos (18,5%).

Aedes scapularis, *Aedes crinifer*, *Culex* (*Culex*) *spp.*,, *Haemagogus leucocelaenus* apresentaram maior número de fêmeas ingurgitadas nos dois municípios. Os resultados obtidos com *Aedes scapularis* sugerem ecletismo, conforme combinações detectadas em amostras de sangue de diferentes fontes. *Haemagogus leucocelaenus* apresentou a maior proporção de amostras contendo sangue humano em relação às demais fontes e essa característica traz implicações, por ser espécie incriminada na transmissão e por se tratar de área de ocorrência de epizootias de febre amarela.

Descritores: Culicidae, hábito alimentar, técnica imunoenzimática ELISA de captura, IgG, isotipos.

ABSTRACT

The knowledge of mosquitoes Culicidae host feeding patterns permits to clarify some aspects related to zoonosis transmission and to estimate the degree of human-vector contact which is relevant in epidemiological studies. Aiming to explore the feeding behavior of these mosquitoes, specimens were collected in the municipalities of Santo Antônio das Missões and Garruchos, Rio Grande do Sul, an epizootic area of sylvatic yellow fever. Engorged females were collected by aspiration from forested areas from September 2005-April 2007 and their blood meals were identified using the avidin-biotin system of immunoenzymatic ELISA capture. Six blood meal sources were tested: bird, cattle, horse, human, monkey and rat. The result achieved with the species-specific IgG1 mAb was unprecedented for mosquito blood meal identification and reinforced the sensibility and specificity of the immunoenzymatic ELISA capture. Of the 190 samples from Santo Antônio das Missões, 60.9% reacted to cattle, 23.6% to human, 9.9% to bird, 1.9% to monkey and 3.7% to mixed blood meals. In Garruchos, of the 158 females collected in Cachoeirinha, 16.0% reacted to bird, 29.6% to cattle, 36.8% to human, 4.0% to horse, 0.8% to monkey and 12.8% to mixed blood, while of the 149 engorged females from São José, blood from cattle accounted for 51.5%, of blood identified, bird and human 11.5%, monkey 6.2%, horse 0.8% and mixed blood 18.5%. Blood engorged females of *Aedes scapularis*, *Aedes crinifer*, *Culex* (*Culex*) *spp.*, *Haemagogus leucocelaenus* predominated in the two municipalities. The results obtained with *Aedes scapularis* suggests its eclecticism, according to the combinations of blood which were detected from different sources. *Haemagogus leucocelaenus* was found to have the highest proportion of samples containing human blood in comparison with other sources, which has implications, on account of being incriminated in the transmission and also for taking into consideration the outbreaks reported that underline the risk of yellow fever.

Descriptors: Culicidae, feeding habits, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, IgG, isotypes

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO 8
2 OBJETIVOS 22
2.1 Objetivo Geral 22
2.2 Objetivos específicos 22
3 MÉTODOS 22
3.1 Área de estudo 23
3.2 Locais de captura de Culicídeos 25
3.3 Pesquisa de adulto para o estudo de hábito alimentar 30
3.4 Teste imunoenzimático ELISA de captura no sistema avidina-biotina 31
3.4.1 Preparo das amostras 31
3.4.2 Identificação do sangue ingerido 32
3.4.3 Padronização do teste para as subclasses de IgG1 e IgG4 humano 34
3.5 Análise estatística 35
4 RESULTADOS 35
4.1 Padronização da técnica imunológica de captura no sistema avidina-biotina 35
4.2 Especificidade da técnica imunoenzimática de captura 35
4.3 Diferenciação de amostras reagentes pela subclasse IgG1 humano 39
4.4 Identificação do sangue ingerido 43
5 DISCUSSÃO 55
6 CONCLUSÕES 66
7 REFERÊNCIAS 68
ANEXOS 79

1 INTRODUÇÃO

Das arboviroses transmitidas por artrópodes, a febre amarela é doença viral nativa da África e importada para as Américas no final do século XVII, incidente sob a forma endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América do Sul (BARRETT e MONATH, 2003; VASCONCELOS, 2003).

A ocorrência das primeiras epidemias de febre amarela nas Américas data de 1647 e 1649, em Barbados, Cuba, Guadalupe e México. A intensidade do comércio entre África, América e Ilhas resultou na expansão da doença através dos portos das grandes cidades americanas, onde se sucederam epidemias urbanas de febre amarela nos anos de 1668 a 1870, que dizimaram populações nas Américas do Norte, Tropical e Sub-Tropical e paralisaram a indústria e comércio (BARRET e HIGGS, 2007).

Não obstante, no século XVIII a doença atingiu a Europa; com focos de transmissão em cidades da Itália, França, Espanha e Inglaterra, entretanto o maior impacto e importância em Saúde Pública deveu-se à sua incidência no Novo Mundo (TOMORI, 2004; BARRET e HIGGS, 2007).

A devastadora e ampla epidemia dos séculos XVII, XVIII e XIX fez com que cientistas e médicos tivessem atenção em responder às questões relacionadas ao mecanismo de transmissão e quais medidas poderiam ser tomadas em relação à redução da morbidade e mortalidade da doença.

O crédito referente à transmissão de febre amarela por mosquitos foi dado a Carlos Finlay, médico cubano, em 1881. Em estudos posteriores, Walter Reed e colaboradores demonstraram a presença do agente em sangue de pacientes e

comprovaram que mosquitos da espécie *Aedes aegypti* poderiam transmitir a doença (MONATH e HEINZ, 1996; BARRETT e MONATH, 2003).

O vírus da febre amarela, considerado como o primeiro agente determinado a causar doença humana e o primeiro vírus provado a ser transmissível por vetor artrópode, foi isolado em macacos do gênero *Rhesus*, por Mahaffy e Bauer em 1927, fato esse datado do século XX, 350 anos após a primeira descrição de caso clínico (MONATH e HEINZ, 1996).

O conceito de transmissão de febre amarela silvestre com o envolvimento de primatas não humanos e espécies silvestres de mosquitos foi posteriormente demonstrado por Soper em 1936 (TOMORI, 2004).

Não antes de 1948, que os países começam a relatar casos e óbitos por febre amarela à Organização Mundial de Saúde (OMS). A doença persiste até hoje, é considerada como reemergente e permanece como causa significante de morbidade e mortalidade com 200.000 casos e 30.000 mortes estimados a cada ano, sendo que desses, 90% são referentes à África. (TOMORI, 2004; BRYANT et al., 2007).

Segundo Monath e Nasidi apud TOMORI (2004), essa estimativa não inclui as sub-notificações uma vez que o número de casos na África pode oscilar em 10 a 500 vezes além dos reportados e similarmente na América do Sul avalia-se a incidência em 10 a 50 vezes maior do que os registros oficiais (p.399).

Entre os anos de 1965 e 1980 o número de casos na África e América do Sul foi semelhante, entretanto no período de 1981 a 2000, as epidemias mais severas de febre amarela incidiram na África. A esse fato, faz-se menção à descontinuidade de medidas de controle da doença, desde a independência dos países africanos em 1960.

No Continente Africano, a zona endêmica de febre amarela estende-se desde a fronteira do sul do Saara até Angola, entre as latitudes 15°N e 15°S. Com maior freqüência, os surtos são descritos a Oeste da África, a isso se atribui à combinação de determinantes extrínsecos e intrínsecos locais (BARRETT e MONATH, 2003; REITER, 2001).

O maior número de casos refere-se à Nigéria, Gana, Costa do Marfim, Libéria, Guiné e Senegal. A doença ocorre principalmente na área de savanas, onde a variabilidade de espécies de mosquito é responsável pela transmissão e ao longo de áreas áridas onde o *Aedes aegypti* é encontrado (MONATH, 2006).

No passado, a doença nas Américas teve registro desde o norte no Panamá até o Sul na Argentina, com maior número de casos descritos no Peru, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guianas e Venezuela. No presente, os três primeiros países detêm aproximadamente noventa por cento dos casos reportados na América do Sul (BARRETT e MONATH, 2003).

No Brasil, a febre amarela foi considerada sério agravo em Saúde Pública nos primórdios do século passado, com grande número de casos em diversas cidades. Em decorrência da vacinação, constante busca e eliminação do vetor urbano, *Aedes aegypti*, a presença do último caso em área urbana foi em 1942 (FRANCO, 1969).

Não obstante, a forma endêmica da doença persistiu em ambiente silvestre com pequeno número de casos anuais, em alguns Estados do Brasil, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste, onde os contatos homem-vetor eram mais freqüentes devido a atividades agropecuárias e extrativismo vegetal, este último, muitas vezes em condições ilegais.

Nessas áreas, a doença ocorre principalmente em lenhadores, seringueiros, vaqueiros, garimpeiros, caçadores, ribeirinhos, praticantes do ecoturismo ecológico e considera-se também sob risco a população que tende a deslocar-se durante o ano para essas regiões à procura de trabalho (MONATH, 1988). Com maior freqüência, os casos da doença são relatados no sexo masculino, devido à exposição (VASCONCELOS et al., 2001a).

A incidência de casos de febre amarela apresentava certa uniformidade até o final da década de 90, cuja variação cíclica de ocorrência era mantida a intervalos regulares de cinco a sete anos.

No entanto, esta série histórica tem apresentado modificações, dado o aumento progressivo de casos confirmados para áreas até então consideradas indenes (VASCONCELOS et al., 2003; CVE, 2007).

A emergência endêmica da febre amarela silvestre nos Estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo, a partir de 2000, seguida de epizootias em primatas no Rio Grande do Sul, representam um novo aspecto da doença (LUNA, 2002; VASCONCELOS, 2002).

As investigações decorrentes desse período vêm demonstrar a expansão da atividade do vírus além da típica fronteira da zona enzoótica, em direção a áreas onde não havia sido assinalado (VASCONCELOS et al., 2003, 2004; CVE, 2007; SVS/MS, 2007).

A presença de variantes quase idênticas do vírus, à longa distância e a intervalos curtos de tempo, levam a concluir que a transposição seja realizada por meio de migração de indivíduos infectados e/ou vetores. (VASCONCELOS et al., 2004; BRYANT et al., 2007; FIGUEIREDO, 2007).

Com os focos naturais do vírus e a reinstalação do *Aedes aegypti* no Brasil em 1976, a partir de um foco em Salvador (NOBRE et al., 1994), cresce a chance da dispersão do vírus para ambientes urbanizados.

Em virtude desse novo aspecto, o risco de recrudescimento e a propagação da doença no território existem, uma vez que as condições climáticas e modificações ambientais são propícias à proliferação do mosquito e a imunização da população humana em áreas de epizootias é parcial e não tem atingido controle satisfatório, dado o deslocamento de indivíduos que participam sob o regime de contrato de trabalho (LIMA, 1985; MONDET et al., 1996; ROBERTSON et al., 1996; MONDET, 2001; VASCONCELOS et al., 2001b, VASCONCELOS, 2002, 2003; GUBLER, 2002; TUBOI et al., 2007).

A doença tem como agente etiológico um arbovírus, constituído de RNA de fita simples, pertencente ao gênero *Flavivirus*, Família *Flaviviridae* (do latim *flavus* = amarelo), cuja cadeia de transmissão envolve dípteros da Família Culicidae e primatas humanos e não humanos.

BRYANT et al. (2007), estimaram por seqüenciamento genético que as amostras circulantes do vírus da febre amarela na África datam de 1500 anos e emergiram nas Américas associadas às rotas dos navios de comércio de escravos, há cerca de 300 a 400 anos, onde se dispersaram em direção oeste através do Continente e permanecem até hoje nas florestas da América do Sul.

O vírus estabeleceu o ciclo enzoótico silvestre entre as bacias dos rios Amazonas, Araguaia-Tocantins, Paraná e Orinoco e utilizou como vetores, mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (VASCONCELOS, 2003).

A dependência de certos artrópodes em obter repasto sangüíneo com a finalidade de requerer energia para o desenvolvimento dos ovos vem atender às condições referentes à transmissão de flaviviroses e muitos outros agentes infecciosos.

Embora o mecanismo de transmissão de um hospedeiro a outro por simples transferência de vírus pelo aparelho bucal do mosquito durante o processo alimentar possa ocorrer, a transmissão biológica é a regra.

Nessa circunstância, faz-se necessária a ingestão de sangue contendo vírus, escape do vírus das células epiteliais do mesentério, infecção da glândula salivar do mosquito e secreção do vírus pela saliva durante novo repasto em hospedeiro vertebrado suscetível (MONATH e HEINZ, 1996).

A circulação e manutenção do vírus da febre amarela na natureza são dependentes fundamentalmente dos vetores. Cabe às fêmeas efetivar a transmissão do vírus amarílico a populações de primatas suscetíveis no decurso da atividade alimentar, ademais, é destacada a ocorrência de transmissão transovariana, que permite ao vírus sobreviver em circunstâncias não favoráveis, durante a estação seca (MONDET et al., 2002).

Por outro lado, primatas humanos e não humanos desempenham papel fundamental como amplificadores temporários de quantidade suficiente de vírus a fim de prover a infecção no mosquito. Nos humanos, ocorre viremia desde o início da infecção, com período de incubação em torno de três a quatro dias, quando anticorpos específicos começam a aparecer.

Muitas espécies de primatas não humanos africanos apresentam quadro de viremia por diversos dias e produzem anticorpos, raro o óbito por infecção, o que já

não ocorre nas espécies americanas. Estas, representadas pelos gêneros *Alouatta* (bugio ou guariba), *Ateles* (macaco-aranha), *Saimiri* (macaco-de-cheiro) e *Aotus* (macaco-da-noite) tendem a manifestar elevada viremia e frequentemente morrem por infecção, enquanto que as espécies dos gêneros Cebus (macaco-prego) e Lagothrix (macaco-barrigudo) desenvolvem infecções subclínicas com viremia e adquirem imunidade (HERVÉ e ROSA, 1983; TOMORI, 2004).

Soma-se a isso, a observação de soropositividade para o vírus em outros animais tais como, marsupiais e preguiças, bem como a notificação do vírus em isolado de morcego frugívoro na África Oriental, o que leva a necessidade de comprovação de seus papéis epidemiológicos no ciclo de transmissão silvestre do arbovírus (BARRETT e MONATH, 2003). Em área de savanas, na África, várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* são responsáveis pela transmissão, principalmente *Ae. africanus*, *Ae. furcifer*, *Ae. metallicus* e *Ae.simpsoni* (BARRET e HIGGS, 2007).

No Brasil, têm-se conhecimento dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes,* no envolvimento na transmissão da forma silvestre da febre amarela. A estes dois gêneros mencionados, descreve-se a presença de exemplares naturalmente infectados até por mais de uma vez (DÉGALIER et al., 1992; VASCONCELOS et al., 1997).

Às espécies *Haemagogus* (*Haemagogus*) *janthinomys* Dyar, 1921 e *Sabethes* (*Sabethes*) *chloropterus* Humboldt, 1819 é atribuído o papel de maior importância na transmissão da febre amarela silvestre, com relatos da presença do vírus em amostras do primeiro, no período de 1993-1994, na região Sudeste do Estado do Maranhão e em municípios do Estado do Pará (VASCONCELOS et al., 1997, 2001a).

Haemagogus janthinomys é encontrado em florestas tropicais úmidas, tem como criadouros ocos de árvore e internódios de bambu (CHADEE et al., 1992; CONSOLI e LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994), as fêmeas exercem atividade hematofágica diurna e apresentam comportamento antropofílico. Essa espécie apresenta extensa distribuição geográfica nas Américas Central e do Sul e está presente em quase 3/4 do território brasileiro (VASCONCELOS et al., 2003; FORATTINI 2002).

Haemagogus (*Conopostegus*) *leucocelaenus* (Dyar e Shannon, 1924) também ocupa ampla área de distribuição, tem como criadouros ocos de árvore e exerce atividade hematofágica diurna. No entanto, apresenta diferença sazonal na abundância em relação às outras espécies do mesmo gênero e, em adição, há indícios de sua sobrevivência em ambiente florestal alterado ou residual (FORATTINI, 2002).

Essa espécie, em conjunto com *Haemagogus janthinomys* e *Haemagogus* (*Haemagogus*) *albomaculatus* Theobald, 1903, constam como as mais importantes na transmissão de febre amarela (CONSOLI e LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Cabe salientar o encontro de infecção natural em espécie de outros gêneros, tais como, *Aedes fulvus, Aedes scapularis* e *Psorophora albipes*, cada uma com um único isolamento do vírus (VASCONCELOS, 2003).

A grande variabilidade de comportamento dos mosquitos do gênero *Haemagogus* ainda com reduzido número de estudos, tem causado dificuldades na análise para definir situações de risco para a comunidade humana. Alterações na dominância e sobrevivência de espécies em função de mudanças climáticas e

ambientais são fatores que podem determinar nova forma de comportamento e circulação viral (GITHEKO et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2001b).

Quanto a esse aspecto, o Estado do Rio Grande do Sul tem apresentado alterações em relação a essa dinâmica, ao ser incluído no passado na zona endêmica de febre amarela e por apresentar o registro de últimos casos da doença na região em 1966 (NOBRE et al., 1994).

Após longo período sem que houvesse a manifestação da presença do vírus, cerca de 80 primatas não humanos foram suspeitos de ter contraído a doença no intervalo de março a maio de 2001 na fronteira entre Brasil e Argentina. A partir de diagnóstico laboratorial realizado em exemplar da espécie *Alouatta fusca* confirma-se a presença da doença na área (SALLIS et al., 2003).

Nesse mesmo episódio foi reportado o isolamento do vírus da febre amarela em exemplares de *Haemagogus leucocelaenus*, procedentes dos municípios de Garruchos e Santo Antônio das Missões, no Estado do Rio Grande do Sul (VASCONCELOS et al., 2003).

Devido à ausência de *Hg. janthinomys* na região, e por ter sido registrada a infecção natural em *Hg. leucocelaenus* nas epizootias de Jaguarí, Mata e Santiago nos anos de 2002 e 2003, confere-se a essa espécie papel relevante pelas epizootias nessas áreas (VASCONCELOS et al., 2003).Considerando a problemática da transmissão, o Rio Grande do Sul, que havia sido classificado como área indene, passa a ser avaliado como área de transição da doença.

Assim sendo, o estudo de hábito alimentar ganha importância nessa área quando se trata de insetos hematófagos, como os culicídeos, que já tem papel

reconhecido como transmissores de doenças e são alvo de intenção de programas de controle e vigilância.

A investigação de fontes hospedeiras nesses artrópodes permite avaliar sua capacidade vetora e representa um avanço na dinâmica de relacionamento desses com o homem, animais e ambiente. O padrão alimentar desses dípteros vem acrescentar informações necessárias à ampliação do conhecimento a respeito de sua adaptação em diferentes ambientes, com vistas à avaliação das relações hospedeiro-vetor e sua magnitude na transmissão da doença (FORATTINI et al., 1987).

Acresce-se a isso, que os locais de captura, a sazonalidade e a variabilidade de animais são fatores que influenciam uma dada espécie, a diversificar o seu comportamento alimentar (FORATTINI, 2002), daí ser necessário explorar todas as estações do ano.

Diversas metodologias são empregadas na pesquisa de fonte alimentar em artrópodes, sendo que a maioria dos estudos que objetivam a investigação do comportamento alimentar desses insetos tem como enfoque a utilização de técnicas imunológicas.

As técnicas imunológicas para detecção de sangue ingerido têm sido utilizadas desde os primórdios de 1900, quando King e Bull em 1923 e Rice e Barber em 1935 adaptaram a técnica de precipitina para determinar a fonte alimentar em mosquitos e outros insetos (EDRISSIAN e HAFISI, 1982). Dentre essas, estabeleceu-se a técnica imunoenzimática ELISA, que foi inicialmente desenvolvida para o diagnóstico de pacientes portadores de malária (VOLLER et al., 1974) e posteriormente adaptada para o estudo do hábito alimentar em culicídeos (BURKOT et al., 1981; EDRISSIAN e HAFISI, 1982).

Diversas modalidades de ELISA foram introduzidas e têm sido freqüentemente utilizadas, de acordo com a concentração de sangue ingerido contido nas amostras e informações que se deseja obter no estudo (SAVAGE et al., 1993; NIEBYLSKI et al., 1994; RUBIO-PALIS et al., 1994; APPERSON et al., 2002; RICHARDS et al., 2006). Com maior sensibilidade e especificidade, a técnica imunoenzimática de captura tem sido a mais indicada para a detecção de sangue ingerido por pequenos dípteros (SERVICE et al., 1986; QUINNELL et al., 1992; SVOBODOVÁ et al., 2003) bem como para mosquitos Culicidae (CHOW et al., 1993; ZINSER et al., 2004; GINGRICH e WILLIANS, 2005; PONLAWAT e HARRINGTON, 2005).

A sensibilidade do ensaio imunoenzimático de captura pode ser ainda aumentada por meio de etapas adicionais. Com mais freqüência, são empregados anticorpos secundários marcados com a vitamina biotina, e a seguir incubados com avidina (um componente protéico da clara de ovo) marcada enzimáticamente, que se liga à biotina com afinidade e especificidade extremamente altas (GUESDON et al., 1979; KENDALL et al., 1983; GOULD et al., 1985; TERNYNCK e AVRAMEAS, 1990; ; COLMENARES et al., 1995; MARASSÁ et al., 2004, 2006; RAMBOZZI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008).

Os imunoensaios de afinidade e especificidade aumentados com avidina-biotina permitem detectar a presença de sangue ingerido em pequenas concentrações em amostras diluídas de diferentes espécies de vetores, bem como evidenciar mais de um repasto efetuado nas múltiplas relações com fontes alimentares (COLMENARES et al., 1995; MARASSÁ et al., 2004, 2005, 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

As vantagens do sistema incluem amplificação do sinal de resposta com redução do “background”, aumento da sensibilidade e confiabilidade do teste.

As imunoglobulinas, que atuam como proteínas marcadoras nos imunoensaios são compostas por uma enorme família de glicoproteínas relacionadas, porém não idênticas, constituídas de duas cadeias L (leve) e duas cadeias H (pesada), ligadas por pontes dissulfídicas, compostas de 96% de polipeptídeos e 4 a 1% de carbohidratos.

As subclasses também diferem entre si, com base nas diferenças antigênicas da cadeia H, no número e localização de pontes dissulfídicas. Cada indivíduo normal expressa todos os subtipos característicos da espécie, pois cada isotipo ocupa um “locus” genético distinto no genoma (PARSLOW et al., 2004).

A acentuada diversidade das imunoglobulinas constituiu durante muito tempo uma grande barreira para a compreensão de sua estrutura. Estudos que tiveram início na década de 50 ampliaram o campo da química das imunoglobulinas.

Em decorrência, foi possível utilizar enzimas e agentes redutores para a digestão ou dissociação das imunoglobulinas em componentes menores, revelando que a diversidade encontrava-se, em grande parte restrita a regiões específicas das moléculas de imunoglobulina. Outras regiões eram muito mais uniformes e puderam ser isoladas na forma mais purificada, tornando-as acessíveis para análise estrutural.

Em 1975, o desenvolvimento de métodos laboratoriais deu origem à tecnologia dos anticorpos monoclonais que permitiram a obtenção de anticorpos homogêneos de praticamente qualquer especificidade em quantidades ilimitadas.

Os anticorpos monoclonais revolucionaram o estudo da imunologia e da biologia celular e têm numerosas aplicações no diagnóstico.

A utilização da imunoglobulina G (IgG) e a variabilidade de IgGs entre espécies tem sido bem documentadas (WASHINO e TEMPELIS, 1983; SERVICE et al., 1986; TESH et al., 1988, TIZARD, 2000).

No homem adulto normal, a imunoglobulina G (IgG) responde por cerca de 75% das imunoglobulinas séricas totais. Existem quatro subclasses distintas, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que apresentam propriedades biológicas diferentes.

As concentrações relativas das quatro subclasses são de aproximadamente 60-70%, 14-20%, 4-8% e 2-6%; o nível sérico (mg/mL) de 9, 3, 1 e 0,5 respectivamente e a meia vida no soro é de 23 dias para IgG1, IgG2, IgG4 e 7 dias para IgG3.

Segundo SERVICE et al. (1986), o emprego de anticorpos monoclonais favorece a obtenção de alta especificidade e por sua vez, a técnica de ELISA de captura no sistema avidina-biotina oferece a possibilidade para o estabelecimento dessa condição (GOULD et al., 1985; TERNYNCK e AVRAMEAS, 1990; RAMBOZZI et al., 2004).

Assim, justifica-se o emprego do método de ELISA de captura para a pesquisa de sangue ingerido em espécies de mosquito Culicidae bem como a utilização da subclasse IgG1 humano para diferenciar fonte sangüínea de primatas humanos e não humanos que se encontram em áreas endêmicas e epidêmicas de febre amarela.

Considerando a ocorrência de epizootias em primatas no Estado do Rio Grande do Sul, em particular nos municípios de Garruchos e Santo Antônio das Missões e dada à presença de espécies de *Hg. leucocelaenus*, *Sabethes chloropterus*, *Sa. albiprivus*, além de outras do gênero *Aedes* e *Culex*, nas capturas efetuadas nos locais de provável infecção, o estudo do hábito alimentar dos mosquitos

comprovados e suspeitos de envolvimento na transmissão do vírus amarílico representa um elemento de predição de risco para populações humanas.

Nesse aspecto, cabe ressaltar que a utilização, pela primeira vez, de anticorpos monoclonais para a identificação espécie específica e determinação de fonte sangüínea entre primatas humanos e não humanos em dípteros da Família Culicidae vêm acrescentar informações e avaliar o papel dessas espécies na manutenção de enzootias e eventuais epizootias, no quadro epidemiológico da febre amarela.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificação e diferenciação espécie-específica pela subclasse IgG1 humano para a pesquisa de fonte sangüínea em dípteros da Família Culicidae, vetores da febre amarela silvestre, pela técnica imunoenzimática ELISA de captura no sistema avidina-biotina, em espécimes capturados em área de ocorrência de epizootias para febre amarela.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica imunológica ELISA de captura no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido em dípteros da família Culicidae.
- Padronizar o teste para as subclasses de IgG humano.
- Demonstrar a especificidade do teste ELISA de captura para a diferenciação de fonte sanguínea de primatas humanos e não humanos.
- Determinar as fontes de repastos sangüíneos para as fêmeas.
- Comparar entre proporções as possíveis diferenças quanto à fonte de sangue ingerido.

3 MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em área epizoótica silvestre, nos municípios de Garruchos e Santo Antônio das Missões no Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1).

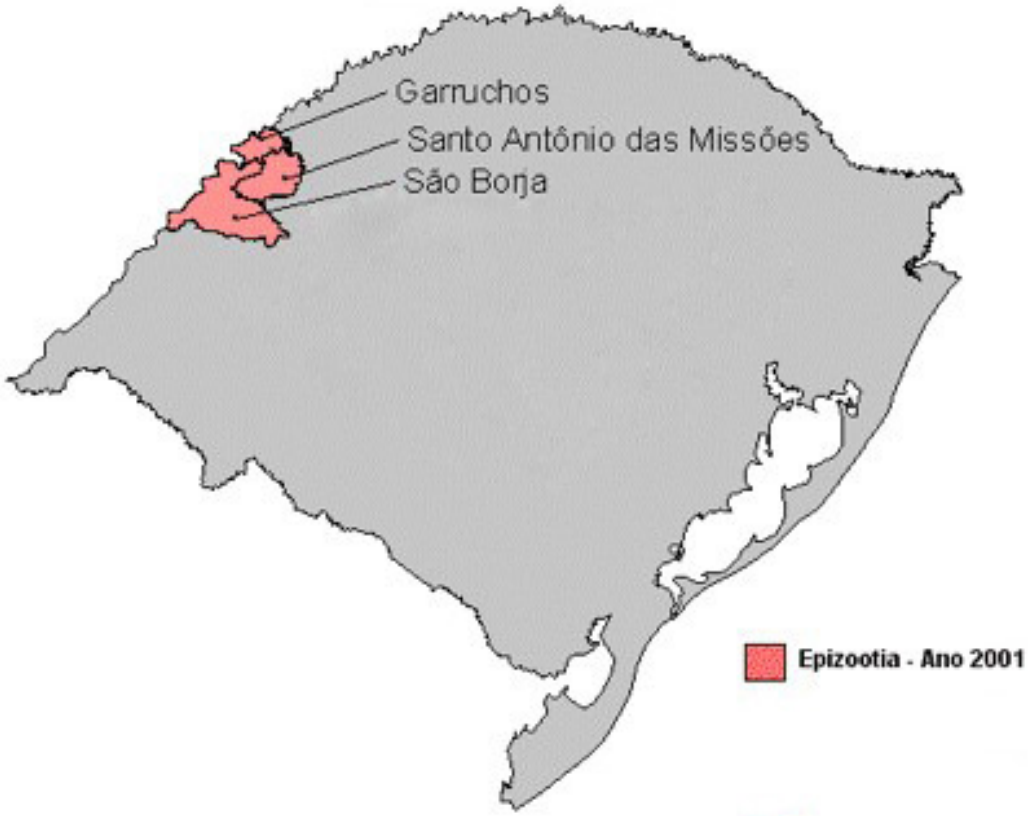

Figura 1- Área de ocorrência de epizootias no Rio Grande do Sul, ano de 2001.

*Extraído de: Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde.

Nesse Estado, as florestas nativas em estágios médio, avançado e inicial correspondem a uma área de 17,55% de todo o território gaúcho. As florestas ombrófila densa e mista correspondem a 3,49%. Estas estão situadas na faixa litorânea e parte da Serra Geral. A floresta semidecidual, com 0,74%, localiza-se na região da bacia hidrográfica do rio dos Sinos, enquanto à decidual com 4,16% limita-se a uma reserva de 17.500 ha, que recebe o nome de Parque Estadual do Turvo. Por outro lado, as florestas de galerias ou matas ciliares ocorrem em todo o Estado, com certa concentração na faixa central às margens de rios e arroios (INVENTÁRIO FLORESTAL, 2001).

O município de Santo Antônio das Missões (55° 21' W, 28° 29 ' S) pertence à Mesoregião Noroeste Rio-Grandense, possui uma área de 1685 km^2 com população de 12.690 habitantes, está a uma altitude de 213m e apresenta clima subtropical (RS VIRTUAL, 2007). Santo Antônio dista 60 km do município de Garruchos e ambos encontram-se a 650 km da cidade de Porto Alegre, RS.

No município de Santo Antônio, a vegetação vertical é do tipo de floresta de galeria, bem como são encontradas ilhas de vegetação mais verticalizada que estão separadas por espaços abertos, normalmente utilizados como pastagens para bovinos, ovinos e cultivo de grãos (Figuras 2, 3).

O município de Garruchos (55° 45' W, 28° 17 ' S) está a uma altitude de 69 m, possui uma área de 831 km^2 com população de 4.051 habitantes, está situado na Mesoregião Sudoeste Rio-Grandense e apresenta clima temperado subtropical (WIKIPÉDIA, 2007).

Garruchos situa-se ao longo da margem esquerda do rio Uruguai e tem fronteira fluvial com a Argentina (Figura 4). A mata nativa desse município é de grande porte e acha-se margeada por campo de pastagem (Figuras 5, 6).

3.2 LOCAIS DE CAPTURA DE CULICÍDEOS

Os locais de captura entomológica foram escolhidos a partir das áreas de ocorrência de epizootias nos anos de 2000 a 2001, nos dois municípios, nos pontos prováveis de infecção.

Em Garruchos foram incluídos dois pontos de captura: Fazenda Cachoeirinha, onde ocorreram epizootias (Figuras 5, 6 e 7) e São José Velho (Figura 8) onde é desconhecida a ocorrência de epizootia em ambiente florestal.

No município de Santo Antônio, uma única área do distrito Cerro do Ouro (Figuras 2 e 3) foi definida como sendo ponto de captura, do interior da mata ao centro distrital representado por peridomicílios.

No geral, a paisagem dessas localidades mostra distribuição descontínua da vegetação florestal, a qual está circundada ora por área agrícola ora por pastagem de bovinos, ovinos e, por vezes, habitações humanas.

Figura 2- Área Cerro do Ouro, município de Santo Antônio das Missões, RS.

Figura 3- Campo de cultivo na área de Cerro do Ouro, Santo Antônio das Missões, RS.

Figura 4- Área ao longo da margem esquerda do rio Uruguai, fronteira com a Argentina, município de Garruchos, RS.

Figura 5- Ponto de coleta em Garruchos.

Figura 6- Margem de mata da Fazenda Cachoeirinha no município de Garruchos, RS.

Figura 7- Área de ocorrência de epizootia na Fazenda Cachoeirinha, Garruchos.

Figura 8- Área de São José Velho, município de Garruchos.

3.3 PESQUISA DE ADULTO PARA O ESTUDO DE HÁBITO ALIMENTAR

As capturas de mosquitos para a identificação do sangue ingerido foram realizadas no período de setembro de 2005 a abril de 2007 no solo da mata, com auxílio de um aspirador elétrico (NASCI, 1981) (Figura 9) e puçá. As fêmeas ingurgitadas foram obtidas por aspiração de 15 minutos, repetida de 4 até 10 vezes por ambiente de mata e extradomicílio.

No campo, os mosquitos foram acondicionados em microtubos e mantidos a frio em caixas de isopor. No laboratório, o material coletado permaneceu em freezer a -20°C, até o momento do teste imunoenzimático de captura.

A identificação taxonômica dos espécimes foi efetuada por Microscopia Estereoscópica e a nomenclatura adotada para identificação foi a de CONSOLI e LOURENÇO de OLIVEIRA, 1994 e FORATTINI, 2002.

Com referência a Tribo Aedini, embora ciente que o subgênero *Ochlerotatus* foi elevado à categoria de gênero, conforme revisão (REINERT, 2000) os exemplares desta amostragem foram considerados como *Aedes* para efeito desse estudo. Considerou-se *Aedes serratus/nubilus*, àquelas fêmeas em que não se observou faixa dourada no mesonoto.

Figura 9- Aspiração em margem de mata, Fazenda Cachoeirinha, Garruchos.

3.4 TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA DE CAPTURA NO SISTEMA AVIDINA-BIOTINA

3.4.1 Preparo das amostras

Os exemplares congelados, bem como os controles, foram macerados em 750uL de solução PBS-gelatina 0,1%. A seguir foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos e os sobrenadantes colhidos para a realização da técnica imunoenzimática de captura. Para o controle positivo utilizaram-se fêmeas (14 exemplares) ingurgitadas nas respectivas fontes analisadas, e para o controle negativo utilizaram-se 14 exemplares machos.

3.4.2 Identificação do sangue ingerido

Os exemplares ingurgitados e identificados foram testados para verificação de sangue ingerido no conteúdo abdominal, de possíveis fontes suscetíveis.

Para definir o espectro de hospedeiros envolvidos na alimentação das fêmeas, foram testadas seis fontes de alimento: ave, bovino, eqüino, humano, macaco e rato. Os anticorpos de captura utilizados no teste foram: anti-ave IgG (H+L) (61-3100, Zymed, USA) lote n° 10364141; anti-bovino IgG (H+L) (01-12-06 Kirkegaard & Perry (KPL), USA) lote n° ZJ044; anti-eqüino IgG (H+L) (01-21-06, KPL, USA) lote n° ZA031; anti-humano IgG (γ) (62-8400, Zymed, USA) lote n° 51202564; anti-macaco IgG (γ) (617-101-012, Rockland,USA) lote n° 16324 e anti-rato IgG (H+L) (62-9500, Zymed, USA) lote n° 31079948.

Os conjugados biotinilados adicionados ao teste foram: anti-ave IgG (H+L) (61-3140, Zymed, USA) lote n° 00861444; anti-bovino IgG (H+L) (16-12-06 KPL, USA) lote n° WJ139; anti-eqüino IgG (H+L) (16-21-06 KPL, USA) lote n° XH048; anti-humano IgG (γ) (62-8440, Zymed, USA) lote n° 51000935R; anti-macaco IgG (γ) (617-106-012, Rockland, USA) lote n° 17692; anti-rato IgG (B7139, Sigma, USA).

A técnica empregada para determinar a presença de sangue ingerido no conteúdo abdominal foi o ensaio imunoenzimático ELISA de captura no sistema avidina-biotina (MARASSÁ et al., 2008).

Microplacas de 96 cavidades (Nunc®, Maxisorp, Denmark) foram sensibilizadas com 50µL/cavidade de anti IgG de cada fonte pesquisada, na concentração de 1,25µg/mL diluídas em PBS 0,1% e incubadas a 4°C por 18 horas. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-Tween20 (P-1379, SIGMA,

USA) por cinco vezes e os sítios livres, bloqueados com 200µL/cavidade com PBS-gelatina 1% (DIFCO, lote 214340), por 3 horas à temperatura ambiente.

Após este período e a cada etapa da reação, foram realizadas lavagens, como mencionado anteriormente, sendo a seguir adicionados 50µL/cavidade dos sobrenadantes das amostras, em duplicata, e dos controles positivo e negativo, sendo as microplacas incubadas a 4°C por 18 horas.

A seguir, acrescentou-se 50µL/cavidade de anti-IgG biotinilado da fonte a ser pesquisada e as placas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Após a incubação e lavagem, foram adicionados 50µL/cavidade de avidina-fosfatase alcalina (A7294, lote 21K4817, SIGMA, USA) na diluição de 1:40.000, permanecendo por mais uma hora à temperatura ambiente.

Como última etapa, foram adicionados 50µL/cavidade do substrato P-nitrophenil-phosphastase disodium (PNPP, # 104-105, lote 118H6128, SIGMA, USA) na concentração de 1mg/mL diluído em tampão dietanolamina 10% (MERCK, USA). A reação foi interrompida após 30 minutos, com adição de 100µL/cavidade de NaOH 3N e a leitura realizada em leitor de ELISA (Multiskan®) em comprimento de onda 405nm.

O ponto de corte da reação foi estipulado pelo emprego de três vezes o valor da média do branco de cada placa, do dia em que foi realizado o teste.

As amostras reagentes para humano e macaco, respectivamente, foram refeitas com a subclasse IgG1 humano.

3.4.3 Padronização do teste para as subclasses de IgG1 e IgG4 humano

Microplacas de 96 cavidades (Nunc®, Maxisorp, Denmark) foram sensibilizadas com 50µL/cavidade de IgG1 anti-humano (05-3300, Zymed, USA) lote n° 268302 e IgG4 anti-humano (05-3800, Zymed, USA) lote n° 267752, em duplicata, nas concentrações de 20µg/mL a 0,625µg/mL diluídas em PBS e incubadas a 4°C por 18 horas. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-Tween20 por cinco vezes e os sítios livres, bloqueados com 200µL/cavidade com PBS-gelatina 1%, por 3 horas à temperatura ambiente.

Após este período e a cada etapa da reação, foram realizadas lavagens, como mencionado acima, sendo a seguir adicionados 50µL/cavidade do tampão PBS-gelatina 0,1% juntamente com 50µL/cavidade das amostras, que compõem o controle positivo do teste. As amostras foram diluídas em duplicata, nas concentrações 1:2 a 1:64 e as microplacas incubadas a 4°C por 18 horas.

A seguir, acrescentou-se 50µL/cavidade de IgG1 anti-humano biotinilado (05-3340, Zymed, USA) lote n° 60706099 e IgG4 anti-humano biotinilado (05-3840, Zymed, USA) lote n° 60303904. Após a incubação e lavagem, foram adicionados 50µL/cavidade de avidina-fosfatase alcalina, na diluição ideal de 1:40.000, permanecendo por mais uma hora à temperatura ambiente.

Como última etapa, foram adicionados 50µL/cavidade do substrato P-nitrophenil-phosphastase disodium na concentração de 1mg/mL diluído em tampão dietanolamina 10%. A reação foi interrompida após 30 minutos, com adição de 100µL/cavidade de NaOH 3N e a leitura realizada em leitor de ELISA (Multiskan®) em comprimento de onda 405nm.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das freqüências do sangue ingerido pelos espécimes de culicídeos capturados foi feita pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2) para proporções. Os resultados foram analisados em nível de significância 5% ($p<0,050$) e utilizou-se o programa MS-EXCEL em sua versão WINDOWS XP para obtenção dos resultados.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOLÓGICA ELISA DE CAPTURA NO SISTEMA AVIDINA-BIOTINA

Os resultados referentes à padronização da técnica imunológica ELISA de captura no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por mosquitos da familia Culicidae encontram-se incluídos nos anexos (MARASSÁ et al, 2008).

4.2 ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA IMUNOENZIMÁTICA DE CAPTURA

Para a obtenção da concentração adequada a ser utilizada no teste, foram realizadas titulações em bloco, variando-se as concentrações de IgG1 e IgG4 anti-humano frente a diferentes diluições das amostras que compõem o controle positivo do teste, em duplicata.

Nas figuras 10 e 11 são apresentados os resultados da padronização para as subclasses IgG1 e IgG4 humano.

Figura 10 - Titulação em bloco para a determinação da concentração ideal de IgG1 anti-humano para o teste imunoenzimático ELISA de captura.

Figura 11 - Titulação em bloco para a determinação da concentração ideal de IgG4 anti-humano para o teste imunoenzimático ELISA de captura.

A concentração ideal de IgG1 anti-humano a ser utilizada na reação foi 5µg/mL para a sensibilização das placas (Figura 12). O ponto de corte da reação foi estipulado pelo emprego de três vezes o valor da média do branco de cada placa e considerou-se a absorbância específica igual ou maior a 0,207 como valor positivo.

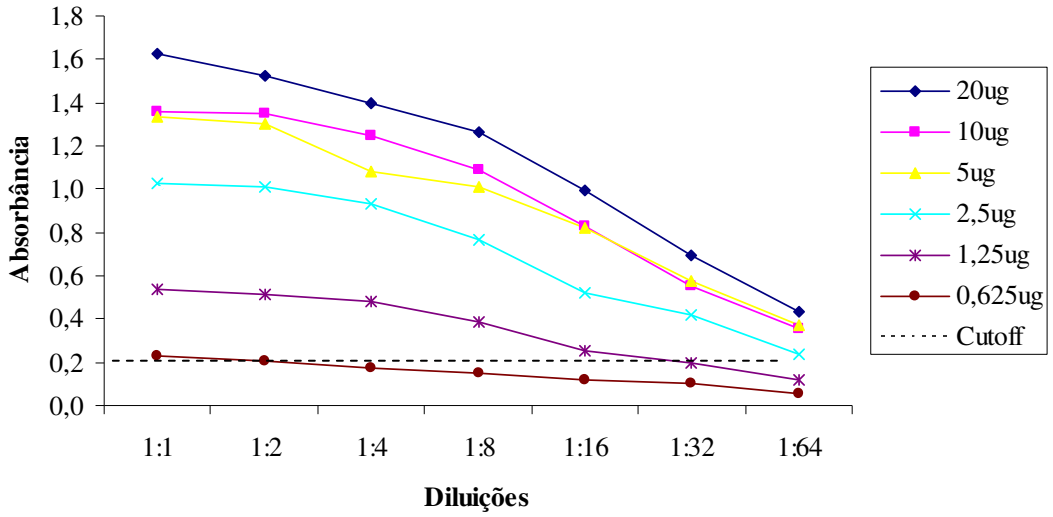

Figura 12 - Determinação da concentração adequada de IgG1 anti-humano, como sendo 5µg/mL, para o ensaio imunoenzimático ELISA de captura destinado à diferenciação de amostras de sangue ingerido por culicídeos.

A distribuição dos valores de absorbância obtidos para a IgG4 anti-humano estão representados na Figura 13. Com base nos resultados encontrados para as diferentes concentrações dessa subclasse, verificou-se ao estipular o ponto de corte

da reação como sendo a absorbância específica igual ou maior a 0,200 como valor positivo, não ser viável determinar uma concentração de IgG4 que pudesse constatar a presença de sangue ingerido.

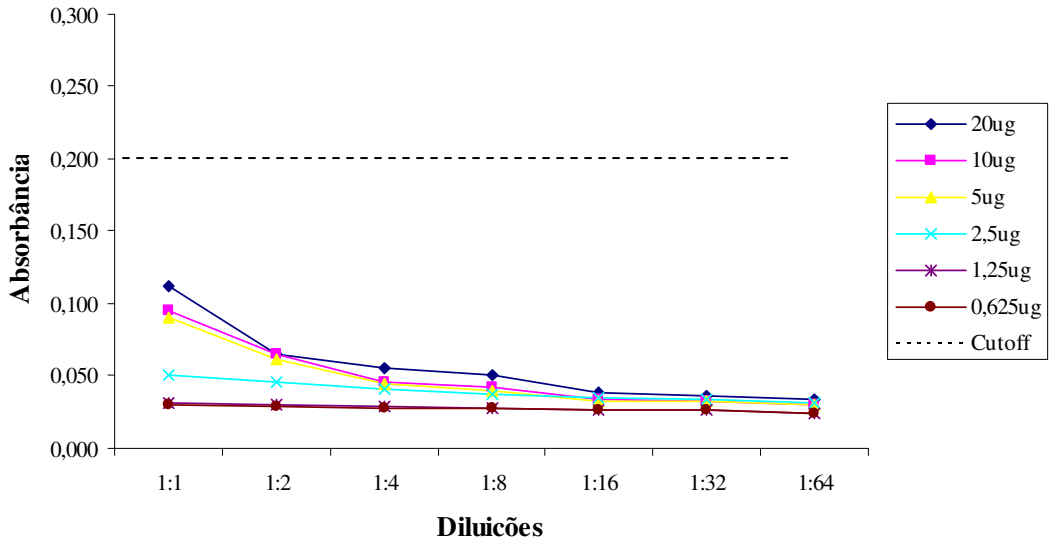

Figura 13 - Determinação da concentração de IgG4 anti-humano para o ensaio imunoenzimático ELISA de captura destinado à diferenciação de amostras de sangue ingerido por culicídeos.

Cumpre mencionar, no que concerne à análise diferencial para a subclasse IgG1 humano, que foram incluídas amostras de soro de primatas das espécies *Cebus* e *Alouatta*. Os valores de absorbância encontrados foram (0,022; 0,030 e 0,021) para *Cebus sp.* e 0,022 para *Alouatta sp.*, que são inferiores a absorbância específica 0,207 considerada como valor positivo para amostras reagentes para humano.

4.3 DIFERENCIAÇÃO DE AMOSTRAS REAGENTES PELA SUBCLASSE IgG1 HUMANO

Após ter sido definida a concentração ideal de IgG1 anti-humano, procedeu-se a diferenciação de fonte sangüínea nos exemplares coletados nos municípios de Garruchos e Santo Antônio das Missões**.** As tabelas 1, 2 e 3 apresentam a distribuição do número de amostras testadas, a determinação da reatividade para a imunoglobulina G (IgG) anti-humano policlonal, anti-macaco policlonal e os resultados da diferenciação espécie específica obtidos pela subclasse IgG1 humano.

Ao considerar o conjunto de amostras reagentes para IgG1 humano na área de mata do município de Santo Antônio, pode-se verificar maior positividade para essa fonte em exemplares das espécies *Hg. leucocelaenus, Ae. scapularis* e *Sa. albiprivus* (Tabela 1).

Quanto às amostras procedentes do município de Garruchos, na área Cachoeirinha prevaleceu o número de amostras reagentes com positividade para sangue humano, sobretudo em exemplares das espécies *Ae. scapularis*, *Hg. leucocelaenus* e *Ps. ferox* (Tabela 2), enquanto que na área de São José observou-se percentual menor em relação ao número total de amostras reagentes para essa fonte de sangue, contudo essa diferença não foi significativa.

Ao comparar as amostras reagentes para humano e macaco nos dois municípios, observou-se diferença significativa (p=0,027) apenas para exemplares de *Hg. leucocelaenus* procedentes do município de Santo Antônio.

Tabela 1 - Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos coletados na mata no município de Santo Antônio das Missões, RS, no período de setembro de 2005 a abril de 2007, de acordo com as imunoglobulinas G (IgG) e diferenciação entre humano e macaco determinada pela subclasse IgG1 humano.

	Espécies								
Imunoglobulina G IgG	*Ae. crinifer*	*Ae. serratus*	*Ae. scapularis*	*Cx.(Cx.) spp.*	*Cx.(Mel.) spp.*	*Hg. leucocelaenus*	*Sa. albiprivus*	*Sa. quasicyaneus*/prox.	*Ps. ferox*
IgG anti-humano (policlonal)	2/2	3/4	8/8	1/1	2/2	17/17	6/6	1/1	4/4
IgG anti-macaco (policlonal)	2/2	2/4	3/8	1/1	2/2	8/17	2/6	1/1	¾
IgG1 anti-humano (monoclonal)	1/2	3/4	8/8	0/1	0/2	17/17	6/6	1/1	3/4
Total exemplares	2	4	8	1	2	17	6	1	4
Total positivo humano	1	3	8	0	0	17	6	1	3
Total positivo macaco	1	1	0	1	2	0	0	0	1

Ae.=Aedes; *Cx.*(*Cx.*)=*Culex (Culex*); *Cx.* (*Mel.)= Culex* (*Melanoconion)*; *Hg.=Haemagogus*; *Sa. quasicyaneus*/prox =*Sabethes quasicyaneus*/proximo *Ps.=Psorophora*

n◦. positivos/n◦. examinados

Tabela 2- Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos coletados na mata, área Cachoeirinha, no município de Garruchos, RS, no período de setembro de 2005 a abril de 2007, de acordo com as imunoglobulinas G (IgG) e diferenciação entre humano e macaco determinada pela subclasse IgG1 humano.

	Espécies									
Imunoglobulina G (IgG)	*Ae. crinifer*	*Ae. serratus*	*Ae. serratus/nubilus*	*Ae. scapularis*	*Hg. leucocelaenus*	*Sa. albiprivus*	*Sa. chloropterus*	*Sa. quasicyaneus*	*Ps. albigenu*	*Ps. ferox*
IgG anti-humano (policlonal)	1/1	7/7	1/1	18/18	11/11	5/5	1/1	1/1	4/4	12/12
IgG anti-macaco (policlonal)	1/1	6/7	0/1	11/18	7/11	2/5	0/1	1/1	3/4	8/12
IgG1 anti-humano (monoclonal)	0/1	7/7	1/1	18/18	11/11	5/5	1/1	1/1	4/4	11/12
Total exemplares	1	7	1	18	11	5	1	1	4	12
Total positivo humano	0	7	1	18	11	5	1	1	4	11
Total positivo macaco	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Tabela 3 - Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos capturados na mata, área São José Velho, município de Garruchos, RS, no período de setembro de 2005 a março de 2007, de acordo com as imunoglobulinas G (IgG) e diferenciação entre humano e macaco determinada pela subclasse IgG1 humano.

	Espécies					
Imunoglobulina G IgG	*Ae. crinifer*	*Ae. scapularis*	*Cx.(Cx.) spp.*	*Hg. leucocelaenus*	*Sa. albiprivus*	*Ps. ferox*
IgG anti-humano (policlonal)	1/1	17/17	3/4	7/7	5/5	2/2
IgG anti-macaco (policlonal)	1/1	17/17	4/4	6/7	5/5	1/2
IgG1 anti-humano (monoclonal)	1/1	14/17	0/4	5/7	4/5	2/2
Total exemplares	1	17	4	7	5	2
Total positivo humano	1	14	0	5	4	2
Total positivo macaco	0	3	4	2	1	0

4.4 IDENTIFICAÇÃO DO SANGUE INGERIDO

Nas tabelas a seguir são apresentados os resultados referentes ao teste imunológico ELISA de captura, para identificação de sangue ingerido em exemplares capturados na área de mata e seus respectivos percentuais para os dois municípios investigados. Os insetos capturados nessas áreas apresentaram em torno de 1/4 a 3/4 de sangue no conteúdo abdominal.

No município de Santo Antônio foram capturadas e identificadas cento e noventa fêmeas ingurgitadas e dessas amostras pôde-se verificar que 84,7% revelaram-se reagentes.

As fêmeas apresentaram sangue ingerido de boi (60,9%), humano (23,6%), ave (9,9%), mistos (3,7%) e macaco (1,9%). O número total de insetos e os percentuais segundo fonte de sangue ingerido encontram-se na Tabela 4.

Culex (*Culex*) *spp.*, *Aedes scapularis*, *Aedes crinifer* e *Haemagogus* l*eucocelaenus* foram as espécies com maior número de exemplares ingurgitados, cujas amostras revelaram-se reagentes.

Alguns mosquitos dessa amostragem apresentaram combinações de sangue ingerido, com o envolvimento de duas diferentes fontes. Essas combinações foram identificadas em seis casos: um *Ae. crinifer*, um *Ae. serratus*, um *Ae. scapularis*, dois *Culex*. (*Culex*) *spp.* e um *Culex* (*Mel.*) *spp.* (Tabela 5).

Ao comparar as proporções obtidas em exemplares dessa área, constatou-se diferença significativa segundo fonte de sangue ingerido apenas para *Culex* (*Culex*) *spp.* ($p= 0,037$) e *Haemagogus leucocelaenus* ($p<0,001$).

Foram realizadas comparações entre par de fontes alimentares, com a inclusão das demais combinações de fontes para cada uma dessas duas espécies.

A tabela 6 apresenta o nível de significância entre pares de fontes e combinações em que se constatou diferença estatísticamente significativa.

Quanto aos exemplares capturados em área adjacente à mata e extradomiciliar, foram identificadas trinta e cinco fêmeas ingurgitadas representadas pela espécie *Culex* (*Culex*) *spp.*

Das catorze fêmeas coletadas em área adjacente à mata, treze foram reagentes. Pôde-se observar a ocorrência de sangue ingerido de ave em (dois exemplares), boi (dez exemplares) e em único exemplar obtido em toda a captura, constatou-se a presença da combinação (boi+rato).

Na área extraflorestal foram coletadas vinte e uma fêmeas das quais vinte mostraram-se reagentes. Dessas, cinco foram reagentes para ave, doze para boi, duas foram reagentes para a combinação (cavalo+ave) e uma para (boi+ave).

Tabela 4 - Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos coletadas na mata, no município de Santo Antônio das Missões, RS, no período de setembro de 2005 a abril de 2007, de acordo com o sangue ingerido.

	Fontes															
	Ave		Boi		Humano		Macaco		Mistos		Reagentes		Não Reagentes		Total	exemplares
Espécies	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ae.crinifer	-	-	15	88,2	1	5,9	-	-	1	5,9	17	100,0	-	-	17	100,0
Ae.serratus	-	-	2	33,3	3	50,0	-	-	1	16,7	6	75,0	2	25,0	8	100,0
Ae.scapularis	-	-	23	74,2	7	22,6	-	-	1	3,2	31	91,2	3	8,8	34	100,0
Ae.sp.	-	-	8	88,9	-	-	-	-	-	-	8	88,9	1	11,1	9	100,0
Culex(Cx.)spp.	13	21,3	46	75,4	-	-	-	-	2	3,3	61	82,4	13	17,6	74	100,0
Culex (Mel)rib.	-	-	2	100,0	-	-	-	-	-	-	2	100,0	-	-	2	100,0
Culex(Mel.)spp.	2	28,6	2	28,6	-	-	2	28,6	1	14,2	7	50,0	7	50,0	14	100,0
Hg. leucocelaenus	1	5,5	-	-	17	94,5	-	-	-	-	18	94,7	1	5,3	19	100,0
Sa.albiprivus	-	-	-	-	6	100,0	-	-	-	-	6	100,0	-	-	6	100,0
Sa.quasicyaneus/prox.	-	-	-	-	1	100,0	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100,0
Ps.ferox	-	-	-	-	3	75,0	1	25,0	-	-	4	66,7	2	33,3	6	100,0
Total	16	9,9	98	60,9	38	23,6	3	1,9	6	3,7	161	84,7	29	15,3	190	100,0

Culex (*Mel.*) *rib.*= *Culex* (Melanoconion) *ribeirensis*
N= número de exemplares

Tabela 5- Freqüência de espécies de Culicídeos de acordo com as combinações de hospedeiros na área de mata de Santo Antônio das Missões, RS, entre setembro de 2005 a abril de 2007.

	Fontes				
Espécies	Humano+ Boi	Macaco+ Ave	Macaco+ Boi	Boi+ Ave	Total
Ae.crinifer	-	-	1	-	1
Ae.serratus	-	-	1	-	1
Ae.scapularis	1	-	-	-	1
Cx.(Cx.)spp.	-	1	-	1	2
Cx.(Mel.)spp.	-	-	-	1	1
Total	1	1	2	2	6

Tabela 6- Comparação de fontes de sangue ingerido de amostras de exemplares de *Culex* (*Culex)sp*. e *Haemagogus leucocelaenus* segundo o nível de significância, na área de mata de Santo Antônio das Missões, RS, entre setembro de 2005 a abril de 2007.

Culex(*Culex*)*spp*.

Fontes		Significância (p)
humano x	ave	0,003
humano x	boi	< 0,001
ave x	boi	0,006
ave x	macaco	0,003
ave x	macaco+boi	0,003
ave x	boi+ave	<0,001
ave x	humano+boi	0,003
boi x	macaco	<0,001
boi x	macaco+boi	<0,001
boi x	humano+boi	<0,001
boi x	macaco+ave	<0,001

Hg.leucocelaenus

Fontes		Significância (p)
humano x	boi	0,027
humano x	macaco	0,027
humano x	macaco+boi	0,027
humano x	boi+ave	0,027
humano x	humano+boi	0,027
humano x	macaco+ave	0,027

No município de Garruchos foram capturadas cento e cinqüenta e oito fêmeas ingurgitadas na área Cachoeirinha e cento e quarenta e nove em São José. A percentagem de exemplares reagentes para as duas áreas foi respectivamente 79,2% e 87,2%.

Assinala-se nesse município a ausência de qualquer reação positiva em relação à fonte de sangue representada por rato. Os resultados globais obtidos na identificação de sangue ingerido encontram-se apresentados nas Tabelas 7 e 9.

Em relação às amostras da área Cachoeirinha pode-se observar que 16% foram reagentes para ave, 29,6% para boi, 36,8% para humano, 4% para cavalo, 0,8% para macaco e 12,8% para fontes mistas. *Culex* (*Culex*) *sp.*, *Ae. scapularis*, *Ps. ferox* e *Hg. leucocelaenus* contribuíram com o maior número de exemplares.

Nessa população as combinações de sangue ingerido foram identificadas em dezesseis casos, conforme é exposto na Tabela 8: um *Ae. crinifer*, três *Ae. serratus*, um *Ae. serratus/nubilus*, cinco *Ae. scapularis*, um *Hg. leucocelaenus*, um *Sa. albiprivus* e um *Sa. quasicyaneus*, em maior número, com envolvimento de sangue humano. Além disso, em único exemplar da espécie *Ae. scapularis* verificou-se a combinação de três fontes (humano+ ave+cavalo).

Ao considerar as comparações entre proporções obtidas nessa área, *Culex* (*Culex*) *spp.* foi a única espécie em que se observou diferença estatísticamente significativa ($p<0,001$) segundo fonte de sangue ingerido. Nesta, a fonte representada por boi, quando comparada às demais e respectivas combinações, observou-se diferença significativa ($p=0,025$).

Quanto aos exemplares procedentes da área de São José, pôde-se observar que a percentagem de reagentes foi de 87,2% (Tabela 9). As fêmeas dessa área

apresentaram sangue de boi (51,5%), ave e humano (11,5%), macaco (6,2%), cavalo (0,8%) e mistos (18,5%).

As combinações de sangue ingerido ocorreram em vinte e quatro casos e estão representadas na Tabela 10.

Culex (*Culex*) *spp.*, *Ae. scapularis* e *Ae.crinifer* foram as espécies com maior número de exemplares ingurgitados, entretanto *Culex* (*Culex*) *spp.* foi a única a apresentar diferença significativa em relação às demais fontes (p=0,002).

Quanto à área de São José, detectou-se a presença de dez amostras reagentes para sangue de macaco em quatro exemplares de *Culex* (*Culex*) *spp.,* três *Ae. scapularis*, dois *Hg. leucocelaenus* e um *Sa. albiprivus*. Os resultados encontrados para essas espécies diferem dos obtidos nas áreas de Santo Antônio e Cachoeirinha.

As comparações entre pares de fontes e respectivas combinações que apresentaram diferença significativa para *Culex* (*Culex*) *spp.* encontram-se representadas na Tabela 11.

Quanto às possíveis diferenças entre proporções referentes às amostras de espécies das duas áreas do município de Garruchos, constatou-se diferença significativa em amostras da espécie *Culex* (*Culex*) *spp.* para sangue de ave (p=0,018) e entre o total de exemplares, para sangue ingerido de boi (p=0,021).

Quando foram comparadas as áreas de mata dos dois municípios, somente a proporção total para sangue ingerido de boi apresentou diferença estatisticamente significante (p=0,011).

Tabela 7 - Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos coletadas na mata, área Cachoeirinha, no município de Garruchos, RS, no período de setembro de 2005 a março de 2007, de acordo com o sangue ingerido.

	Fontes																	
	Ave		Boi		Humano		Macaco		Cavalo		Mistos		Reagentes		Não Reagentes		Total	
Espécies	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	Exemplares	
Ae.crinifer	2	22,2	6	66,7	-	-	-	-	-	-	1	11,1	9	75,0	3	25,0	12	100,0
Ae.serratus	2	20,0	1	10,0	4	40,0	-	-	-	-	3	30,0	10	76,9	3	23,1	13	100,0
Ae.serratus/nub.	3	60,0	1	20,0	-	-	-	-	-	-	1	20,0	5	83,3	1	16,7	6	100,0
Ae,scapularis	1	3,6	5	17,8	14	50,0	-	-	3	10,8	5	17,8	28	75,7	9	32,3	37	100,0
Ae.sp.	-	-	1	33,3	-	-	-	-	2	66,7	-	-	3	50,0	3	50,0	6	100,0
Culex (Cx.)spp.	10	33,3	20	66,7	-	-	-	-	-	-	-	-	30	85,7	5	14,3	35	100,0
Culex (Mel.) spp.	2	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	50,0	2	50,0	4	100,0
Hg. leucocelaenus	-	-	-	-	11	91,7	-	-	-	-	1	8,3	12	100,0	-	-	12	100,0
Sa.albiprivus	-	-	-	-	4	80,0	-	-	-	-	1	20,0	5	71,4	2	28,6	7	100,0
Sa.chloropterus	-	-	-	-	1	100,0	-	-	-	-	-	-	1	50,0	1	50,0	2	100,0
Sa.quasicyaneus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100,0	-	-	1	100,0
Ps.albigenu	-	-	1	20,0	4	80,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	-	-	5	100,0
Ps.ferox	-	-	2	14,3	8	57,1	1	7,2	-	-	3	21,4	14	77,8	4	22,2	18	100,0
Total	20	16,0	37	29,6	46	36,8	1	0,8	5	4,0	16	12,8	125	79,2	33	20,8	158	100,0

Tabela 8 - Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos coletadas na mata, área Cachoeirinha, município de Garruchos, RS, no período de setembro de 2005 a março de 2007, de acordo com o sangue ingerido.

	Fontes						
Espécies	Humano+ Ave	Humano+ Boi	Boi+ Ave	Boi+ Cavalo	Boi+ Macaco	Humano+ Ave+Cavalo	Total
Ae.crinifer	-	-	1	-	1	-	1
Ae.serratus	3	-	-	-	-	-	3
Ae.serratus/nub.	-	1	-	-	-	-	1
Ae.scapularis	2	1	-	1	-	1	5
Hg.leucocelaenus	-	-	1	-	-	-	1
Sa. albiprivus	1	-	-	-	-	-	1
Sa.quasicyaneus	1	-	-	-	-	-	1
Ps.ferox	3	-	-	-	-	-	3
Total	10	2	1	1	1	1	16

Tabela 9 - Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos coletadas na mata, área São José Velho, município de Garruchos, RS, no período de setembro de 2005 a março de 2007, de acordo com o sangue ingerido.

	Fontes																	
	Ave		Boi		Humano		Macaco		Cavalo		Mistos		Reagentes		Não Reagentes		Total	
Espécies	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Ae.crinifer	-	-	14	82,3	-	-	-	-	-	-	3	17,7	17	100,0	-	-	17	100,0
Ae.serratus	-	-	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100,0
Ae.scapularis	-	-	19	50,0	10	26,3	2	5,2	1	2,7	6	15,8	38	92,7	3	7,3	41	100,0
Ae.sp.	-	-	4	66,7	-	-	-	-	-	-	2	33,3	6	100,0	-	-	6	100,0
Ad.squamipennis	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100,0
An.evansae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100,0
An. (Ano.)sp.	-	-	2	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100,0	-	-	2	100,0
An.(Nys.)galvaoi	-	-	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100,0
Culex (Cx.)spp.	14	29,2	24	50,0	-	-	3	6,2	-	-	7	14,6	48	80,0	12	20,0	60	100,0
Culex (Mel.)spp.	-	-	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	33,3	2	66,7	3	100,0
Hg. leucocelaenus	-	-	-	-	2	28,6	2	28,6	-	-	3	42,8	7	87,5	1	12,5	8	100,0
Ma.(Ma.) titillans	-	-	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100,0
Sa.albiprivus	-	-	-	-	2	40,0	1	20,0	-	-	2	40,0	5	100,0	-	-	5	100,0
Ps.ferox	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	1	50,0	2	100,0	-	-	2	100,0
Total	15	11,5	67	51,5	15	11,5	8	6,2	1	0,8	24	18,5	130	87,2	19	12,8	149	100,0

Ad=Aedeomyia, *An.*(*Ano.*)*sp=Anopheles*(*Anopheles*)*sp*, *An.*(*Nys.*)=*Anopheles*(*Nyssorhinchus*), *Ma.*(*Ma.*)= *Mansonia* (*Mansonia*)

Tabela 10 - Distribuição do número de amostras de espécies de Culicídeos coletadas na mata, área São José Velho, município de Garruchos, RS, no período de setembro de 2005 a março de 2007, de acordo com o sangue ingerido.

	Fontes						
Espécies	Humano+ Ave	Humano+ Boi	Macaco+ Ave	Ave+ Boi	Ave+ Cavalo	Boi+ Cavalo	Total
Ae.crinifer	1	-	-	1	-	1	3
Ae.scapularis	4	-	1	1	-	-	6
Ae.sp.	-	-	-	-	-	2	2
Cx.(Cx.)spp.	-	-	1	3	2	1	7
Hg.leucocelaenus	3	-	-	-	-	-	3
Sa.albiprivus	1	1	-	-	-	-	2
Ps.ferox	1	-	-	-	-	-	1
Total	10	1	2	5	2	4	24

Tabela 11- Comparação de fontes de sangue ingerido de amostras de exemplares de *Culex* (*Culex) spp*. segundo o nível de significância na área de mata de São José Velho, município de Garruchos, RS, entre setembro de 2005 a março de 2007..

Culex (Cx.)spp.

Fontes		Significância (p)
humanox	ave	0,002
ave x	boi	0,001
ave x	cavalo	0,027
ave x	humano+ave	0,002
ave x	humano+boi	0,002
ave x	boi+cavalo	0,027
boi x	ave+cavalo	0,002

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, as mudanças ecológicas produzidas por atividades humanas são apontadas como uma das causas que contribuem para a expansão geográfica de vetores e arbovírus (DASZAK et al., 2001; VASCONCELOS et al. 2001c; KRUSE et al. 2004; PATZ et al., 2004; SUTHERST, 2004).

Segundo GITHEKO et al. (2000), VASCONCELOS et al. (2003) e PATZ et al. (2004), alterações ambientais e climáticas no ecossistema são identificadas como fatores que ocasionam o desencadeamento de novos processos de interação hospedeiro-vetor pela recomposição dos espécimes vertebrados e seleção de culicídeos mais aptos nas áreas estudadas. Esses, por sua vez, apresentam-se sob diferentes aspectos, segundo o local e biodiversidade.

A espécie *Hg. leucocelaenus* sobrevive a diferentes mudanças ambientais transcorridas tanto no Brasil como em outras regiões americanas (ROBERTS et al., 1984; CAMARGO-NEVES et al., 2005; GOMES et al., 2007).

Nesse contexto também se concentram os trabalhos VASCONCELOS et al. (2004), que fazem referência à variabilidade genética entre variantes do vírus de febre amarela circulantes e identificam grupamentos associados a epizootias em diferentes regiões geográficas. Esses autores sugerem que a expansão do vírus fora da área enzoótica possa ser favorecida por movimentos migratórios de portadores de vírus, bem como por adaptação de populações do vetor a ambientes alterados.

Embora se considere que populações de primatas não humanos possibilitem a manutenção temporária do vírus em focos naturais e a circulação viral, um grande número de espécies de mosquitos e vertebrados podem ocasionalmente ser infectados

na natureza, o que suscita maior esclarecimento na participação desses em áreas de ocorrência de epizootias e/ou casos de febre amarela silvestre.

O hábito alimentar dos mosquitos, revelado no estudo, mostra a possibilidade de algumas espécies de Culicidae estarem com sangue ingerido dos animais, porquanto o papel vetorial dependerá do nível das inter-relações entre esses. Este fato sugere a necessidade de serem quantificadas as inter-relações aí definidas.

As regiões avaliadas neste estudo, Santo Antônio das Missões e Garruchos, encontram-se situadas a Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul e essas áreas, recentemente foram consideradas como sendo de evidência de circulação viral (SVS/MS, 2007). Durante os eventos epizoóticos de 2000 e 2001, *Hg. leucocelaenus* foi encontrado naturalmente infectado, levantando a suposição de sua participação naqueles eventos (VASCONCELOS et al., 2003)

A importância em conhecer fontes alimentares desses insetos nessas áreas é essencial sob o ponto de vista epidemiológico, e vem contribuir para melhor entendimento na participação desses insetos no ciclo de transmissão da doença.

Diferentes técnicas, mais tradicionalmente a técnica de precipitina têm sido empregadas para a identificação de repastos sangüíneos de mosquitos e outros artrópodes hematófagos e têm caracterizado o grupo hierárquico, tais como, ordens e classes de fontes alimentares envolvidas no hematofagismo (WASHINO e TEMPELIS, 1983; SERVICE et al., 1986; SAVAGE et al., 1993). Embora sua execução seja relativamente simples, requer alto consumo de anti-soro e apresenta menor especificidade e sensibilidade.

Por outro lado, já há algum tempo, a técnica imunoenzimática ELISA tem sido utilizada para a identificação de hábito alimentar de mosquitos (BURKOT et al.,

1981; SAVAGE et al., 1993; NIEBYLSKI et al., 1994; RUBIO-PALIS et al., 1994) alimentados em diversos animais e confere a identificação de fonte sangüínea a nível de gênero. Essa técnica tem se mostrado eficiente, por apresentar maior sensibilidade e especificidade, bem como sua automação permite o processamento e investigação de um maior número de amostras, o que representa um aspecto de importância numa investigação epidemiológica.

A sensibilidade e especificidade podem ser aumentadas com a introdução da técnica ELISA de captura. SERVICE et al. (1986), aplicaram essa técnica para a identificação de sangue ingerido por culicídeos e culicóides e ressaltaram as vantagens de seu uso como proposição alternativa, em vista da possibilidade de reconhecer a fonte sangüínea em amostras contendo quantidades reduzidas de sangue recém-ingerido.

Portanto, a identificação de repastos sangüíneos pela técnica imunológica ELISA de captura reúne as condições para o desenvolvimento de pesquisas com essa finalidade.

Neste estudo, a opção do emprego do teste imunoenzimático de captura fazendo uso do sistema fosfatase alcalina avidina-biotina vêm favorecer o desempenho, em virtude de cada molécula de avidina apresentar quatro sítios de ligação com a biotina. A utilização de anticorpos para a detecção de sistemas baseados na interação de alta afinidade entre avidina e biotina proporciona inclusão da amplificação do sinal e redução do “background”, aumento da sensibilidade e confiabilidade do teste ELISA de captura (GUESDOM et al.,1979; KENDALL et al., 1983; TERNYNCK e AVRAMEAS, 1990).

Em pesquisas realizadas com variantes do vírus de febre amarela GOULD et al. (1985) demonstraram que o emprego do sistema avidina-biotina pôde favorecer a execução. Dentre as vantagens que o emprego do sistema possibilita, apontam-se os resultados obtidos na detecção de fontes sangüíneas em amostras de exemplares de pequenos dípteros da subfamilia Phlebotominae (COLMENARES et al. 1995; MARASSÁ et al., 2004, 2005, 2006; OLIVEIRA et al. 2008) e assinala-se que neste estudo, o sistema avidina-biotina pôde ser adaptado e pela primeira vez aplicado para a identificação de sangue ingerido por culicídeos (MARASSÁ et al., 2008).

Inicialmente, empregou-se o teste de ELISA de captura utilizando anti-IgG das respectivas fontes, humano e macaco, para identificar sangue ingerido. Contudo, os resultados obtidos para essas espécies próximas, revelaram reação cruzada devido à utilização de anticorpos policlonais, o que pôde ser evidenciado conforme Tabelas 1 a 3.

Como alternativa, poderiam ser adotadas combinações entre soros heterólogos e incubações, a fim de eliminar reações cruzadas, entretanto, decidiu-se por empregar anticorpos monoclonais que determinassem uma resposta com maior especificidade a grupos de espécies próximas (homogêneas).

SERVICE et al. (1986) já sugeriam como opção, a aplicação de anticorpos monoclonais no teste de ELISA, quando da necessidade em obter maior especificidade.

Com esse enfoque, sob o ponto de vista imunológico, foi analisada a resposta contra duas subclasses de imunoglobulinas, IgG1 e IgG4 que, respectivamente, compartilham com a incidência de percentuais de concentração de 60-70% e 2-6% no soro em humano.

Vale ressaltar que neste estudo demonstra-se pela primeira vez o emprego de anticorpos monoclonais para o reconhecimento de fonte sangüínea em mosquitos da família Culicidae e se determina a presença de sangue humano em amostras desses exemplares mediante a utilização da subclasse IgG1 humano por meio da técnica ELISA de captura no sistema avidina-biotina, conforme é demonstrado nas Figuras 10 e 12.

No que concerne à subclasse IgG4 humano, uma possível explicação para a não detecção desta imunoglobulina em amostras contendo sangue humano, seria por esta IgG apresentar-se em menor concentração sérica, aliada ao pequeno volume de sangue que fêmeas desses mosquitos podem conter no trato digestivo. Segundo JEFFERY (1956), de acordo com a espécie, esse volume pode variar em cerca de 2,75 mg de sangue para exemplares de *Aedes aegypti* até 3,46 mg para *Anopheles quadrimaculatus*.

A determinação espécie específica de fonte sangüínea é considerada um parâmetro de importância para estimar a capacidade vetora de culicídeos envolvidos no ciclo de transmissão de febre amarela silvestre, dado esse de grande valia para o conhecimento da epidemiologia desta arbovirose. Portanto, observar a tendência quanto a prática do hematofagismo em espécies de culicídeos, permite avaliar as possíveis implicações de primatas não humanos através do papel dos vetores para a definição de riscos à população humana.

Dentro de um quadro geral, os resultados obtidos demonstraram maior tendência por repastos sangüíneos em mamíferos para a maioria dos mosquitos Culicidae nas áreas dos dois municípios pesquisados. Esse aspecto observado é

concordante com outras pesquisas, que revelaram o envolvimento de humano, aves e bovinos como fontes comuns aos culicídeos (ALENCAR et al., 2008).

Os resultados de amostras não reagentes poderiam ser atribuídos a outras fontes sangüíneas que não foram incluídas no ensaio imuonenzimático ou em virtude do processo digestivo já se encontrar em fase avançada de absorção.

Nas espécies *Ae. crinifer*, *Ae. serratus* e *Ae. scapularis* o repasto em bovinos ocorreu nas áreas de Garruchos e Santo Antônio e, nesta última, apesar do caráter ornitófilo parecer discreto, a prática do hematofagismo foi observada em várias fontes, inclusive compartilhando combinações mistas. Esses resultados vêm corroborar com os observados por diversos autores mesmo considerando as diferentes localidades observadas (FORATTINI et al., 1981, 1987, 1989 ; HERVÉ e ROSA, 1983; MITCHELL et al., 1987; LOURENÇO DE OLIVEIRA e HEYDEN, 1986; GOMES et al., 2003).

O comportamento eclético em relação a fontes sangüíneas para *Ae. scapularis* já havia sido destacado por FORATTINI et al. (1981), bem como ter sido incriminada como espécie vetora da encefalite pelo vírus Rocio no Sudeste do País (MITCHELL e FORATTINI, 1984). Por sua vez, VASCONCELOS et al. (2003) acrescem a essa espécie o encontro de infecção natural por vírus amarílico.

Além disso, *Ae.scapularis* apresenta importância epidemiológica dada a adaptação às condições alteradas do meio ambiente, por seu caráter antropofílico e endofílico e por freqüentar ambiente domiciliar com certa constância (FORATTINI et al., 1981,1989,1995).

Quanto aos representantes de *Culex* (*Culex*) *spp.*, os resultados revelaram variabilidade na atratividade para as fontes de sangue ingerido de mamíferos e aves,

conforme a área de captura dos dois municípios, sendo que a maior porcentagem de amostras foi reagente para sangue de ave e boi.

MITCHELL et al. (1987) em estudos conduzidos na Província de Santa Fé, Argentina, obtiveram para exemplares de *Culex* (*Culex*) maior afinidade para sangue de bovino e LOURENÇO DE OLIVEIRA e HEYDEN (1986) em investigações realizadas em área de planície, em Jacarepaguá, RJ, detectaram para essas espécies maior atração por mamíferos e aves. Embora nestas últimas observações constasse a presença de fêmeas com sangue humano, o comportamento das espécies de *Culex* (*Culex*) nos dois municípios investigados apresentou padrão semelhante.

A espécie *Psorophora ferox* compareceu nesse estudo com poucos exemplares ingurgitados, sendo que o predomínio de reações positivas para esses, sobretudo por sangue humano, vem corroborar com os resultados expostos por LOPES et al. 1981 e FORATTINI et al.1987, 1989, particularmente relacionado a isolamento de arbovírus em exemplares capturados em ambiente silvestre. Em relação a esse culicídeo cabe também mencionar o isolamento do vírus Rocio em exemplares coletados na região de Mata Atlântica, por ocasião da epidemia de encefalite, no Estado de São Paulo (LOPES et al. 1981; IVERSSON, 1994)

Quanto às espécies do gênero *Sabethes*, observou-se maior freqüência de exemplares apresentando sangue ingerido humano, fato esse que FORATTINI (1965) e HERVÉ E ROSA (1983) já mencionavam ao apontar a capacidade desses mosquitos em sugar o homem e outros animais.

Estas observações também vão ao encontro com as expostas por GUIMARÃES et al. (1987) no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ, onde a maior parte dos exemplares apresentaram hábito antropofílico. No ciclo da febre

amarela, *Sabethes chloropterus* consta como o representante com maior evidenciação no ciclo silvestre do vírus amarílico, contudo na população desse estudo foi coletado um único exemplar ingurgitado com sangue humano.

Haemagogus leucocelaenus demonstrou a maior proporção de amostras contendo sangue humano. Essa característica torna-se bem evidente nos exemplares capturados na área de Santo Antônio, que por sua vez, na ausência de *Hg. janthinomys*, reforça a suspeita de que está exercendo o papel de vetor principal.

Além disso, acresce-se a esses dados a identificação de amostras reagentes para ave nessa área, bem como em amostras em que foram detectadas combinações de sangue (humano + ave) na área de São José, resultados que vêm corroborar com os encontrados por DAVIS (1944) e GUIMARÃES et al. (1987).

Hg. janthinomys considerado como espécie muito antropofílica (FORATTINI, 2002), também apresenta no seu espectro de fontes alimentares as aves e roedores.

No município de Santo Antônio, em que o maior percentual de fêmeas de *Hg. leucocelaenus* com sangue humano foi registrado, quando comparado com as demais fontes sangüíneas, é sugestivo o fato da grande capacidade dessa espécie em sobreviver em ambientes de transição. Nesse aspecto, a influência da proximidade da mata com as residências possibilita um contato maior do mosquito com os humanos.

Outro aspecto a ressaltar foi quanto à freqüência de 9,25% obtida para as combinações de fonte sangüínea, nos espécimes capturados nos dois municípios. Apesar de não representarem grande número, os resultados revelaram variabilidade de fonte alimentar.

Segundo GILLIES (1954, 1955), há várias indicações de que é necessário mais do que um repasto sangüíneo para a maturação de ovos em populações de aedíneos e anofelinos no habitat silvestre, daí ser importante conhecer as combinações múltiplas de fontes na área estudada.

EDMAN e SCOTT (1987) e BRIGEL e HÖRLER (1993) consideram que os repastos mistos podem ser resultantes do comportamento defensivo de hospedeiros e o estado nutricional do mosquito. No que diz respeito ao comportamento desses, as aves e roedores são mais propensos à freqüência de interrupções durante o repasto (FORATTINI et al., 1987).

A essas observações, de mais de uma fonte alimentar no trato digestivo cabe indicar que ou essas espécies não apresentaram concordância gonotrófica, ou que a ingestão de sangue foi interrompida por reação defensiva provocada pela fonte alimentar. Vale destacar que o maior percentual de combinações de fontes foi obtido com a presença de sangue humano, o que segundo FORATTINI et al. (1987) vêm demonstrar a importância desse comportamento em estudos epidemiológicos.

Segundo Gubler e Mitchell apud JOHNSON et al. (2002), a variabilidade genética em relação à suscetibilidade ao vírus pelo mosquito, sua densidade e índice de nutrição, além de condições ambientais são características que se inserem no contexto mais específico da capacidade vetora. Populações de mosquitos de diferentes regiões têm demonstrado essas oscilações quanto à suscetibilidade ao vírus e esta pode apresentar modificações, de acordo com o passar do tempo.

Em varias ocasiões, adultos de *Haemagogus leucocelaenus* foram capturados em áreas abertas e residências próximas da mata (PINHEIRO et al., 1981; FORATTINI e GOMES, 1988; CAMARGO-NEVES et al., 2005). A capacidade

dessa espécie em sobreviver em ambientes em fase de transição foi apontada em estudos realizados por estes últimos autores em investigações entomológicas no Estado de São Paulo, onde também foram reportados casos de febre amarela silvestre.

Em virtude da presença de *Haemagogus leucocelaenus* já ter sido detectada em diversas regiões do Rio Grande do Sul (VASCONCELOS et al., 2003 e GOMES et al., 2007) e diante do registro de epizootias, que expressam um alerta sobre a presença do vírus, tem-se por considerar, sob o ponto de vista de Saúde Pública, o risco quanto à transmissão de febre amarela.

Por outro lado, é necessário fazer referência quanto ao papel fundamental que desempenham os culicídeos na cadeia epidemiológica das demais arboviroses, bem como a participação de animais vertebrados no ciclo enzoótico natural. O envolvimento de populações de roedores, marsupiais e algumas espécies de morcegos contribui na manutenção do índice de infecção viral, reforçada por sua vez devido à substituição por novos suscetíveis (FORATTINI 1966; IVERSSON 1994; NELSON e WILLIAMS 2007) e com isso leva a supor condições propícias a disseminação ao homem de infecções por arbovírus.

Em relação às aves, além de serem consideradas como reservatório de importantes arboviroses, os hábitos migratórios de algumas espécies possibilitam a dispersão do vírus particularmente do grupo das encefalites, para outros ambientes (FERREIRA et al. 1994; NELSON e WILLIAMS 2007).

A esse aspecto, em particular na área de Santo Antônio, onde a maior parte dessas populações de mosquitos apresentou sangue humano, enfatiza-se a

importância em dar continuidade ao monitoramento, bem como em áreas que se encontram justapostas às de circulação do vetor.

Os resultados obtidos neste estudo representam uma amostra da população para a qual o teste imunoenzimático ELISA de captura vem corresponder. Nessa abordagem, a demonstração da capacidade em se obter o reconhecimento de fontes sangüíneas próximas, por meio da utilização de anticorpos monoclonais, define aspectos do comportamento alimentar dessas populações de culicídeos.

Na ocorrência de epizootias, vale a intenção em propor a inclusão da técnica imunoenzimática ELISA de captura, como indicador para a vigilância, quando houver a necessidade de formalizar estudos epidemiológicos em áreas de risco.

6 CONCLUSÕES

1. A identificação de sangue ingerido por mosquitos da família Culicidae é demonstrada pela primeira vez através da técnica imunoenzimática ELISA de captura no sistema avidina-biotina, bem como é determinada a diferença interespecífica entre fonte sangüínea de primatas por meio da subclasse IgG1 humano.

2. Quanto às duas subclasses testadas IgG1 e IgG4, conclui-se que somente a subclasse IgG1 humano permitiu detectar reatividade em amostras de fêmeas desses culicídeos que apresentaram sangue ingerido no conteúdo abdominal.

3. Os resultados encontrados nesta amostragem vêm comprovar a sensibilidade e especificidade da técnica imunoenzimática ELISA de captura através do reconhecimento de sangue ingerido nestes mosquitos, representado por 84% de amostras reagentes, ao que também se demonstra pela subclasse IgG1, que por corresponder apenas com parte do total, 60-70% da concentração de IgG, pôde ser empregada na identificação de pequenas concentrações de sangue ingerido de culicídeos.

4. Há evidências que revelam o ecletismo de *Aedes scapularis* em relação ao hábito alimentar, representado por combinações de sangue de hospedeiros, que poderiam ser explicadas, ao menos parcialmente, na atração exercida pelo número de mamíferos encontrados nesse ambiente.

5. Quanto a possíveis diferenças em relação a fontes hospedeiras, somente observou-se diferença significativa para sangue ingerido de boi entre os espécimes capturados nos dois Municípios.

6. *Haemagogus leucocelaenus* demonstrou a maior proporção de amostras contendo sangue humano em relação às demais fontes. Essa característica torna-se evidente nos exemplares capturados na área de Santo Antonio e esse aspecto merece atenção, por ser espécie incriminada na transmissão, sobretudo, por se tratar de áreas de ocorrência de epizootias de febre amarela e também porque foram os mais encontrados em áreas próximas a residências.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar J, Marcondes CB, Serra-Freire NM, Lorosa ES, Pacheco JB, Guimarães AE. Feeding patterns of *Haemagogus capricornii and Haemagogus leucocelaenus* (Diptera:Culicidae) in two Brazilian States (Rio de Janeiro and Goiás). J Med Entomol. 2008; 45: 873-76.

Apperson CS, Harrison BA, Unnasch TR, Hassan HK, Irby WS, Savage HM, Aspen SE, Watson DW, Rueda LM, Engber BR, Nasci RS. Hostfeeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes. J Med Entomol. 2002; 39: 777-85.

Barrett ADT, Monath TP. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. Ad V Res. 2003; 61: 291-315.

Barrett ADT, Higgs S. Yellow fever: A disease that has yet to be conquered. Annu. Rev. Entomol. 2007; 52: 209-29.

Bryant JE, Holmes EC, Barret ADT. Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. PLoS Pathogens. 2007; 3: 668-73.

Briegel H, Hörler E. Multiple blood meals as a reproductive strategy in *Anopheles* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1993; 30: 975-85.

Burkot TR, Goodman WG, Defoliart GR Identification of mosquito blood meals by enzime-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med. Hyg. 1981; 30: 1336-41.

Camargo-Neves VLF de, Poletto DW, Rodas LAC, Pachioli ML, Cardoso RP, Scandar SAS et al. Entomological investigation of a sylvatic yellow fever area in São Paulo State, Brazil. Cad Saúde Pública. 2005; 21: 1278-86.

Chadee DD, Tikasingh ES, Ganesh R. Seasonality, biting cycle and parity of the yellow fever vector mosquito *Haemagogus janthinomys* in Trinidad. Med Vet Entomol. 1992; 6: 143-148.

Chow E, Wirtz RA, Scott TW. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J Amer Mosq Control Assoc. 1993; 9: 195-205.

CVE- Centro de Vigilância Epidemiológica. Informe Técnico- Febre Amarela. São Paulo; 2007. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/FAINFORME.htm.

Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wollf M, et al. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. J Med Entomol. 1995; 32: 229-33.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância epidemiológica no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. Acta Trop. 2001; 78: 103-16.

Davis DE. A comparison of mosquitoes captured with avian bait at different vegetation levels. Rev Ent. 1944; 15: 209-15.

Dégalier N, Rosa APAT, Hervé J-P, Rosa JFST, Vasconcelos PFC, Silva VLRSM, de Barros VLRS, Dias LB, Rosa EST, Rodrigues SG. A comparative study of yellow fever in African and America. Ciênc Cult (J Braz Assoc Adv Sc.) 1992; 44:143-51.

Edman JD, Scott TW. Host defensive behavior and the feeding success of mosquitoes. Insect Sci Appl. 1987; 8: 617-22.

Edrissian GH, Hafizi A. Aplication of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of *Anopheles* mosquito bloddmeals**.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1982; 76: 54-6.

Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, Souza LTM, Iversson LB. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. Rev Inst Med trop São Paulo. 1994; 36: 265-74.

Figueiredo LTM. Arboviroses emergentes no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40: 224-29.

Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: EDUSP; 1965.

Forattini OP. Investigações sobre focos naturais de arbovírus. [tese de cátedra]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública; 1966.

Forattini OP, Gomes AC, Santos JLF, Galati EAB, Rabello EX, Natal D. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1981; 15: 557-86.

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: 171-87.

Forattini OP, Gomes Ac. Biting activity of *Aedes scapularis* (Rondani) and *Haemagogus* mosquitoes in Southern Brazil (Diptera:Culicidae). Rev Saúde Pública. 1988; 22: 84-93.

Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Kakitani I, Marucci D. Preferências alimentares e domiciliação de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, com especial referência a *Aedes scapularis* e a *Culex* (*Melanoconion*). Rev Saúde Pública. 1989; 23: 9-19.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 9- Synanthropy and epidemiological vector role of *Aedes scapularis* in South-Eastern Brazil. Rev Saúde Pública. 1995; 29: 199-207.

Forattini OP. Culicidologia Médica. São Paulo: EDUSP; 2002.

Franco O. History of the Yellow fever in Brazil. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1969; 21: 315-512.

Gillies MT. The recognition of age-groups within populations of *Anopheles gambiae* by the pré-gravid rate and the sporozoite rate. Ann Trop Med Parasitol. 1954; 48: 58-74.

Gillies MT. The pre-gravid phase of ovarian development in *Anopheles funestus*. Ann Trop Med Parasitol. 1955; 49: 320-5.

Gingrich JB, Williams GM. Host-feeding patterns of suspected West Nile Virus mosquito vectors in Delaware, 2001-2002. J Am Mosq Control Assoc. 2005; 21: 194-200.

Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JA. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. Bull WHO. 2000; 78: 1136-47.

Gould EA, Buckley A, Cammack N. Use of the biotin-streptavidin interaction to improve Flavivirus detection by immunofluorescence and ELISA tests. J Virol. Methods. 1985; 11: 41-8.

Gomes AC, Silva NN, Marques GRAM, Brito M. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley region, State of São Paulo, Brazil. J Vector Ecol. 2003; 28: 74-8.

Gomes AC, Torres MAN, Ferri L, Costa FR, Silva AM. Encontro de Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus (Diptera:Culicidae), no Município de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40: 487-8.

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. Arch Med Res. 2002; 33: 330-42.

Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem Citochem. 1979; 27: 1131-39.

Guimarães AE, Arlé M, Machado NM. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. IV Preferência Alimentar. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82: 277-85.

Hervé JP, Rosa APAT. Ecologia da febre amarela no Brasil. Fundação SESP. 1983; 28: 11-9.

Inventário Florestal Contínuo do Rio Grande do Sul- 2001. Disponível em: http://corabc.ufsm.br/ifcrs/frame.htm

Iversson LB. Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico sobre arbovírus patogênicos para o homem na região da Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Rev Inst Med trop São Paulo. 1994; 36:343-53.

Jeffery GM. Blood meal volume in *Anopheles quadrimaculatus*, *A. albimanus* and *Aedes aegypti*. *Exp. Parasitol*., 1956, 5,371-5.

Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Filippis AMB, Vilarinhos PTR, Resende MC.et al. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. Trans R Soc.Trop Med. Hyg. 2002; 96: 611-13.

Kendall C, Ionescu-Matiu I, Dreesman GR. Utilization of biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J Immunol Methods. 1983; 56: 329-39.

Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. Emerg Infect Dis. 2004; 10: 2067-72.

Lima JTF. Risco de urbanização da febre amarela no Brasil. Cad. Saúde Pública 1985; 1: 377-85.

Lopes OS, Sacchetta LA, Francy DB, Jakob WL, Calisher CH. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio vírus from Psorophora ferox (Humboldt, 1919). Am J Epidemiol. 1981; 113: 122-5.

Lourenço-de-Oliveira R, Heiden R. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera:Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calábria), em Jacarépaguá, Rio de Janeiro. IV. Preferências alimentares quanto ao hospedeiro e freqüência domiciliar. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81: 15-27.

Luna EJA. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. Rev Bras Epidemiol. 2002; 5: 229-43.

Marassá AM, Consales CA, Galati EAB. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva,1912). Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37: 441-6.

Marassá AM, Consales CA, Galati EAB. Blood meal identification in *Nyssomyia intermedia* and Nyssomyia neivai (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Region São Paulo State, Brazil. In: Anais do Proceedings of the Fifth International Symposium on Phlebotomine Sandflies; 2005 Apr. 17-21; Gammarth. Tunis: v.82, p.128.

Marassá AM, Consales CA, Galati EAB, Nunes VLB. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva,1912) e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39: 183-6.

Marassá AM, Rosa MDB, Gomes AC, Consales CA. Biotin/avidin sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for Culicidae mosquito blood meal identification. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2008; 14: 303-12.

Mitchell CJ, Forattini OP. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. J Med Entomol. 1984; 21: 34-7.

Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini MS, Christensen HA, Darsie RF, Jakob WL. et al. Host-feeding patterns of Argentine mosquitoes (Diptera:Culicidae) collected during and after an epizootic of western equine encephalitis. J Med Entomol. 1987; 24: 260-7.

Monath TP. Yellow fever. In: Monath TP, editor. The arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton, Florida; 1988. p.139-231.

Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, editor. Fields Virology. 3.ed. Philadelphia; 1996. v.1, p. 961-1033.

Monath TP. Yellow fever as an endemic/epidemic disease and priorities for vaccination. Bull Soc Pathol Exot. 2006; 99: 341-7.

Mondet B, Rosa APAT, Vasconcelos PFC. Les risques d'épidémisation urbaine de La fièvre jaune au Brésil par les vecteurs de La dengue. Bull Soc Path Exot. 1996; 89: 107-14.

Mondet B. Considérations sur l´épidémiologie de la fiévre jaune au Brésil. Bull Soc Pathol Exot. 2001; 94: 260-7.

Mondet B, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa ES, Rodrigues SG, Travassos da Rosa JFS et al. Isolation of yellow fever virus from nulliparous *Haemagogus* (*Haemagogus*) *janthinomys* in eastern Amazonia. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2002; 2: 47-50.

Nasci RS. A light weight batterypowered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. Mosq News. 1981; 41: 808-11.

Nelson KE, Williams CFM. Infectious disease Epidemiology: Theory and Practice. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers; 2007.

Niebylski ML, Savage HM, Nasci RS, Craig Jr. GB. Blood hosts of *Aedes albopictus* in the United States. J Amer Mosq Control Assoc. 1994; 10: 447-50.

Nobre A, Antezana D, Tauil PL. Febre amarela e dengue no Brasil: Epidemiologia e controle. Rev Soc Bras Med Trop. 1994; 27(3 Supl): 59-66.

Oliveira AG, Marassá AM, Consales CA, Dorval MEC, Fernandes CE, Oliveira GR, et al. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psichodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. Acta Trop. 2008; 107:238-41.

Parslow TG, Stits DP, Terr AI, Imboden JB. Imunologia Médica. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004.

Patz Ja, Daszak P, Tabor GM, Aguirre AA, Pearl M, Epstein J. et al. Environ Health Perspect. 2004; 112: 1092-8.

Pinheiro FP, Rosa APT, Moraes MAP. An epidemic of yellow fever in Central Brazil, 1972-1973. II- Ecological studies. Amer J Trop Med Hyg. 1981; 30: 204-11.

Ponlawat A, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. J Med Entomol. 2005; 42: 844-9.

Quinnell RJ, Dye C, Shaw JJ. Host preferences of phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. Med Vet Entomol. 1992; 6: 195-200.

Rambozzi L, Menzano A, Lanvin S, Rossi L. Biotin-avidin amplified ELISA for detection of antibodies to *Sarcoptes sacabiei* in chamois (*Rupicapra sp*). Vet Res. 2004; 35: 701-8.

Reinert JF. New classification for the composite genus Aedes (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus Ochlerotatus to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. J Am Mosq Control Assoc. 2000; 16: 175-88.

Reiter P. Climate change and mosquito-borne disease. Env Health Pers. 2001; 109 (Suplement 1): 141-61.

Richards SL, Ponnusamy L, Unnasch TR, Hassan HK, Apperson CS. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of Central North Carolina. J Med Entomol. 2006; 43: 543-51.

Rio Grande do Sul virtual 2007, Disponível em: http://www.rsvirtual.net/cgi-bin/dados/webdata

Roberts DR, Peyton EL, Pinheiro FP, Balderrama F, Vargas R. Associations of arbovirus vectors with gallery Forest and domestic environments in south-eastern Bolivia. Bull Pan Am Health Organ. 1984; 18: 337-50.

Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, Leduc JW, Esteves K. Yellow fever a decade of reemergence. JAMA. 1996; 276: 1157- 62.

Rubio-Palis Y, Curtis CF, Gonzáles C, Wirtz RA. Host choice of anopheline mosquitoes in a malaria endemic area of western Venezuela. Medc Vet Entomol. 1994; 8: 275-80.

Sallis ESV, Barros VLRS, Garmatz SL, Fighera RA, Graça DL. A case of yellow fever in a Brown howler (*Alouatta fusca*) in Southern Brazil. J Vet Invest. 2003; 15: 574-6.

Savage HM, Niebylski ML, Smith GC, Mitchell CJ, Craig-Jr GBJ. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) at a temperate North American site. J Med Entomol. 1993; 30: 27-34.

Service MW, Voller A, Bidwell DE. The enzime-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of blood-meals of haematophagous insects**.** Bull Ent Res. 1986; 76: 321-30.

Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. Clin Microbiol Reviews. 2004; 17: 136-73.

SVS/MS- Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Febre Amarela. Guia de Vigilância Epidemiológica. São Paulo; 2007. Disponível em: http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia vig epid novo2.pdf.

Svobodová M, Sádlová J, Chang KP, Volf P. Short report: Distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68: 6-9.

Ternynck T, Avrameas S. Avidin-biotin in enzyme immunoassays. In: Meth Enzymol. Academic Press, Inc. 1990; v. 184, p. 469-81.

Tesh RB, Chen WR, Catuccio D. Survival of albumin, IgG, IgM, and complement (C3) in human blood after ingestion by *Aedes albopictus* and *Phlebotomus papatasi*. Am J Trop Med Hyg. 1988; 39: 127-30.

Tizard IR. Veterinary Immunology. 13- Antibodies. 6.ed.; 2000. p.139-48.

Tomori O. Yellow fever: The recurring plague. Crit Rev Clin Lab Sci. 2004; 41: 391-427.

Tuboi SH, Costa ZGA, Vasconcelos PFC, Hatch D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007; 101: 169-75.

Vasconcelos PFC, Rodrigues SG, Degallier N, Moraes MAP, Rosa JFST, Rosa EST, et al. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: epidemiologic and entomologic findings. Am J Trop Med Hyg. 1997; 57: 132-7.

Vasconcelos PFC, Rosa AP, Rodrigues SG, Rosa ES, Monteiro HA, Cruz AC. et al. Yellow fever in Pará State, Amazon Region of Brazil, 1998-1999: Entomologic and epidemiologic findings. Emerg Infect Dis. 2001a; 7 (Suplement 3): 565-9.

Vasconcelos PFC, Costa ZG, Rosa EST, Luna E, Rodrigues SG, Barros VLRS, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: Implications of climatic alterations in disease spread. J Med Virol. 2001b; 65: 598-604.

Vasconcelos PFC, Rosa AP, Rodrigues SG, Rosa EST, Dégallier N, Rosa JFST. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. Cad Saúde Pública. 2001c; 17(Supl): 155-64.

Vasconcelos PFC. Febre Amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. Rev Bras Epidemiol. 2002; 5: 244-58.

Vasconcelos PFC. Febre amarela. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: (2) 275-293.

Vasconcelos PFC, Sperb AF, Monteiro HAO, Torres MAN, Sousa MRS, Vasconcelos HB, et al. Isolation of yellow fever virus from Haemagogus leucocelaenus in Rio Grande do Sul State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 97: 60-2.

Vasconcelos PFC, Bryant JE, Rosa APAT, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett ADT. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. Emerg Infect Dis. 2004; 10: 1578-84.

Voller A, Bidwell D, Huldt G, Engvall E. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. Bull WHO. 1974; 51: 209-11.

Washino RK, Tempelis CH. Mosquito host blood meal identification: methodology and data analysis. A Rev Ent. 1983; 28: 179-201.

Wikipédia 2007. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki

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 humans and birds. J Insect Sci. 2004; 4: 1-3.

Received: August 17, 2007
Accepted: November 22, 2007
Abstract published online: November 24, 2007
Full paper published online: May 31, 2008

J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.
V.14, n.2, p.303-312, 2008.
Original paper.
ISSN 1678-9199.

BIOTIN/AVIDIN SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR CULICIDAE MOSQUITO BLOOD MEAL IDENTIFICATION

MARASSÁ A. M. (1), ROSA M. D. B. (2), GOMES A. C. (2), CONSALES C. A. (3)

(1) Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil; (2) Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; (3) Pasteur Institute, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT: The knowledge of mosquitoes Culicidae host feeding patterns is basic to understand the roles of different species and to indicate their importance in the epidemiology of arthropod-borne diseases. A laboratory assay was developed aiming at standardizing the biotin-avidin sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, which was unprecedented for mosquito blood meal identification. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) activity was evaluated by the detection of titers on each sample of the 28 blood-fed *Culex quinquefasciatus.* In light of the high sensitivity that the technique permits, by means of small quantities of specific antibodies commercially provided and phosphatase substrate which reinforces additional dilutions, human and rat blood meals were readily identified in all laboratory-raised *Culex quinquefasciatus* tested. The assay was effective to detect human blood meal dilutions up to 1:4,096, which enables the technique to be applied in field studies. Additionally, the present results indicate a significant difference between the detection patterns recorded from human blood meal which corroborate the results of host feeding patterns.

KEY WORDS: biotin/avidin sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, Culicidae, blood meal identification.

CONFLICTS OF INTEREST: There is no conflict.

CORRESPONDENCE TO:

ANA MARIA MARASSÁ. Laboratório de Parasitoses Sistêmicas, Instituto Adofo Lutz, São Paulo, Brasil. Phone: +55 11 3068-2891. Email: anamarassa@usp.br.

INTRODUCTION

Blood meals taken by Culicidae mosquitoes constitute an important parameter to determine the extension of hosts which may be included in the feeding patterns in different zoonoses cycles. In singular habitats, the blood feeding behavior may provide information with reference to the mosquitoes adaptation and may contribute to the evaluation of their vectorial capacity in epidemiological studies.

Several mainly serological methods have been used by previous investigators to identify blood meals taken by Culicidae (1, 14, 16). Among them, the ELISA test is considered an alternative due to its high sensitivity and specificity to express host-feeding activity (2, 4, 6, 7, 12).

In addition, the establishment of the sandwich ELISA method provided the detection of very small volumes of blood ingested by several arthropod vectors as well as of mixed feeds on different hosts (8-10, 15).

This study aimed to standardize the biotin-avidin ELISA method, which was unprecedented for the identification of blood meal in Culicidae mosquitoes, in order to characterize the feeding habits of the species which are accounted to spread diseases.

Culex quinquefasciatus was selected to take part in this experiment due to its abundance in residential area and easiness of laboratory rearing, as well as based on its importance as an urban vector and as an experimental model to make use of the technique in endemic and epidemic areas where different zoonoses are transmitted by Culicidae.

MATERIALS AND METHODS

Forty-two laboratory-reared *Culex quinquefasciatus* were included in this study. They were originated from the colony of the Laboratory of Entomology, São Paulo Public Health School, USP, Brazil.

The emerging adults were separated in two groups of females and one of males, consisting of 14 individuals each, which had been kept isolated at room temperature at 23–27°C.

Artificial Xenodiagnosis

A blood sample (5ml) was collected from one human individual and from one *Rattus rattus* for artificial xenodiagnosis which involved 14 females of each group of female *Culex quinquefasciatus* kept in the laboratory.

At 24h interval after feeding, the engorged females and males were killed by freezing and stored at -20°C until the ELISA test was performed.

Preparation of Mosquito Samples

Mosquitoes were individually prepared for the test by grinding with a plastic pestle in 750µl of 0.01M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, with 0.1% gelatin and centrifuged at 10,000Xg for 10 min, and the supernatant was used for blood meal analyses.

To standardize the test, positive control samples consisted of a 10µl aliquot of each supernatant from the 14 females, which had fed on the blood sample of each host, and the negative control sample was constituted of a 10µl aliquot of each supernatant from the 14 males.

Optimization of the Sandwich Assay

Reagent concentrations were optimized by chequerboard titrations to determine the highest sensitivity and lowest background of mosquito suspensions.

ELISA was conducted using ninety-six well microplates (Nunc®, Maxisorp, Denmark) covered with 50µl/well of each anti-IgG (H+L) host-specific [anti-human IgG 6284-00 Zymed, USA; anti-rat IgG 6295-00, Zymed, USA], diluted in PBS at concentrations of 20µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml, 2.5µg/ml, 1.25µg/ml and 0.625µg/ml and incubated overnight at 4°C. Plates were blocked with PBS/1% gelatin and kept covered at room temperature for 3h.

Each plate was washed five times with PBS-0.05%Tween20 (P-1379, Sigma, USA); then, the competitive reaction was performed in two consecutive wells by addition of 50µl/well of the PBS/0.1% gelatin and 50µl/well of each positive control in each plate. Those samples were diluted from 1:50 to 1:3,200. After 18h at 4°C, biotin conjugated anti-human IgG (6284-40, Zymed,USA) and biotin-conjugated anti-rat IgG (B7139, Sigma,USA) were added.

After 1h at room temperature, 50µl/well of avidin-alkaline phosphatase conjugate (A7294, Sigma,USA) in PBS/1% gelatin was distributed. After 1h, the enzymatic reaction was obtained by addition of p-nitrophenyl phosphate (Sigma Chemical) in diethanolamine buffer. Absorbance was measured by spectrophotometry (Multiskan ® EX) at λ405nm.

ELISA Activity

After the primary antibody concentrations had been established, ELISA activity was evaluated by detecting titers on each sample of the 28 blood-fed *Culex quinquefasciatus*.

The individual blood meal was double diluted with ELISA buffer (PBS/0.1% gelatin) and the positive and negative controls for each host were included in each plate.

To titer *Culex quinquefasciatus* samples containing human blood, 5 $\log_2$ (1:32) was considered as the initial dilution and to titer samples containing *Rattus rattus* blood, 4 $\log_2$ (1:16) was used.

Titers were expressed as $\log_2$ of the reciprocal of the highest dilution at which the absorbance was equivalent to three times the background values.

Variables related to the host samples were analyzed separately and the means were log transformed. Student's t test (PROG SPSS 10.0 for Windows) was used to determine whether there were significant differences in the mean of human and rat samples ($p<0.001$).

RESULTS

As shown in Figures 1 and 2, chequerboard titrations were done with the objective to determine the highest sensitivity and lowest background of mosquito suspensions including the two hosts by the addition of the positive controls in two consecutive wells, and the optimal concentration of anti-human IgG and anti-rat IgG to coat plates was 1.25µg/ml.

Based on what had been settled down for blood-fed specimens of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (8, 10), the concentrations of 1µg/ml of biotin anti-human IgG, 2µg/ml of biotin anti-rat IgG and 1:40,000 dilution of avidin were incorporated. This protocol for ELISA had the objective to minimize the consumption of reagents without interfering with the test sensitivity.

According to Figures 1 and 2, the absorbance values which allowed the cutoff point to optimize the sandwich assay were 0.350 for human blood meal sample and 0.240 for rat blood meal sample.

The next step was to verify the avidin-biotin ELISA test activity by the titration of the samples which were bound for the detection of the smallest blood meal dilution from mosquitoes fed on human and rat blood.

The ELISA detected human blood meals in all samples that were tested (Figure 3) and the mean value was $10.36\log_2$; 1.39∂; $1.94\sqrt{}$. The absorbance value for cutoff was 0.237.

For each plate, positive and negative controls were included and the mean values were determined as $11\log_2$ and $1\log_2$.

According to what is observed in Figure 3, the mean value for human blood meal dilutions was 1:2,048; nevertheless, the assay detected blood meal dilutions up to 1:4,096 ($12\log_2$).

Results of the dispersion of the 14 samples of females that had been fed on rat blood are also represented in Figure 3 and the mean value was $5.5\log_2$; 0.76∂; $0.58\sqrt{}$. The absorbance value for cutoff was 0.226.

Positive and negative controls were also included in each plate and the mean values were determined as $6\log_2$ and $1\log_2$.

The present results indicate a significant difference in samples of *Culex quinquefasciatus* which had fed on human and rat blood ($U=1$; $z=-4.57$; $p<0.001$).

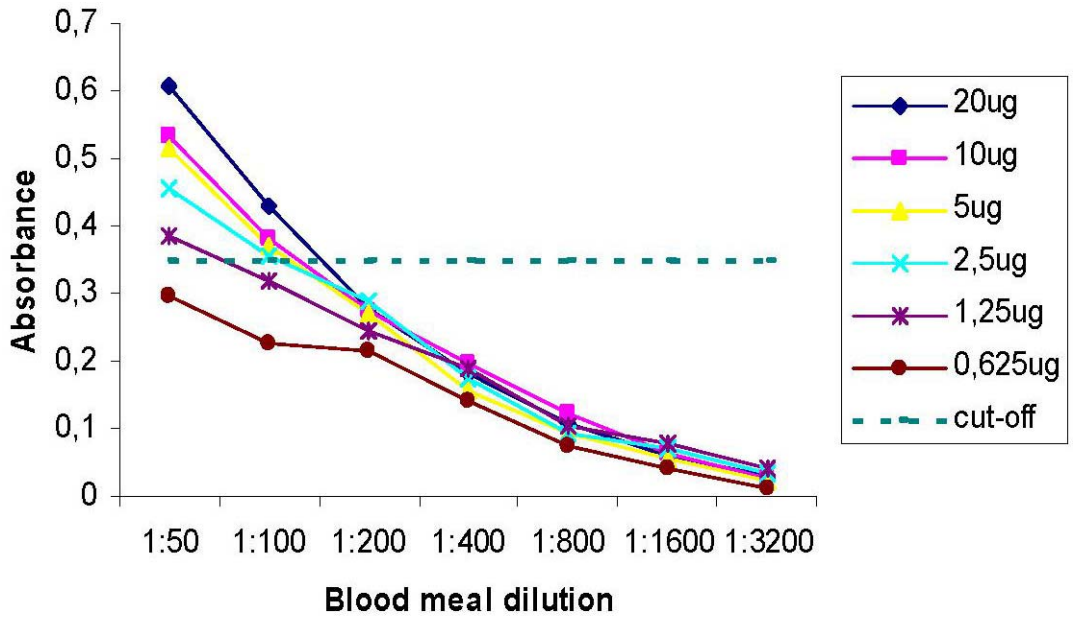

Figure 1. Optimization of the biotin/avidin ELISA assay for identifying human blood meal dilutions for *Culex quinquefasciatus*.

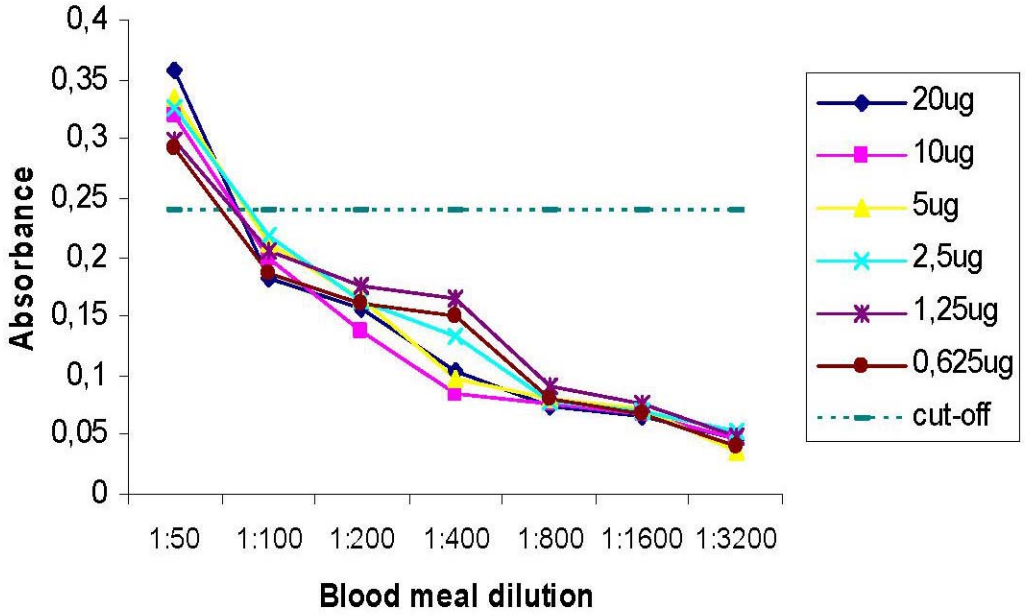

Figure 2. Optimization of the biotin/avidin ELISA assay for identifying rat blood meal dilutions for *Culex quinquefasciatus*.

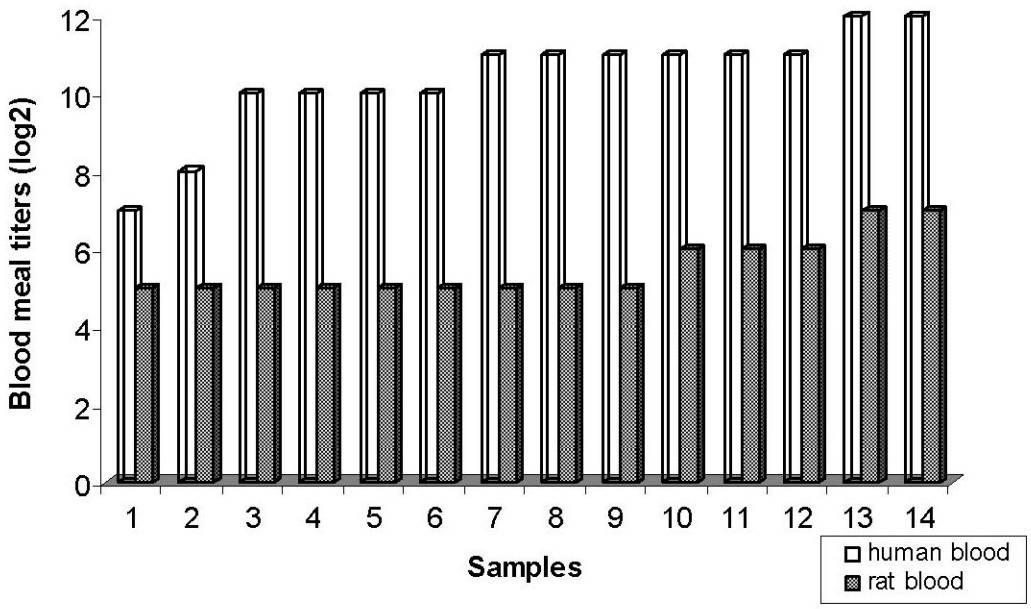

Figure 3. Titers distribution for identified human and rat blood meals of *Culex quinquefasciatus*.

DISCUSSION

The need to further lean data on the activity and frequency at which Culicidae mosquitoes take their blood meals are important to better understand the host-vector relationship, representing an advance in the dynamics of their interrelationship with men, animals and the environment.

The ELISA has fulfilled those conditions and has been used in many ecological investigations (5, 11, 12, 15). In regard to the high sensitivity and specificity, the choice of the avidin-biotin ELISA method described in this study also offers the advantage, based on sensitivity, to detect small amounts of blood taken by phlebotomine sandflies (8, 9, 10) and has been widely applied in other studies (3, 17).

In relation to the samples that were utilized in this study, it was demonstrated that with small concentrations of anti-IgG (1.25µg/ml), anti-IgG biotin-conjugated (1µg/ml for human samples and 2µg/ml for rat samples) and with the avidin dilution of 1:40,000, the test was effective to determine and quantify each one of the samples from this investigation.

Those results are due to the phosphatase substrate (13) which provides additional dilutions and also offers the option of carrying out several tests.

In the second phase of this evaluation, which involved the quantification of samples, the dilution of 1:2,048 that corresponds to $11\log_2$ was the most frequent at the titers detection for human blood meals of *Culex quinquefasciatus* samples (Figure 3). The assay also detected blood meal dilutions up to 1:4,096 of *Culex quinquefasciatus*, which correspond to $12\log_2$, and the difference between titers of human and rat blood samples was patent.

Although, there was a difference in the ELISA method that was used in this investigation, Beier *et al*. (5) could also detect human blood meal dilutions up to 1:3,200 for frozen *Anopheles stephensi* samples.

In this study, the difference between the detection patterns recorded from human blood meal of *Culex quinquefasciatus* corroborate the host feeding results that were obtained by several authors (4, 11, 14, 18), even considering the heterogeneity of samples that are captured in the field.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the Secretary of Health Surveillance/Ministry of Health [Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde], for research funds, the colleagues from the Laboratory of Entomology of São Paulo Public Health School/USP for the specimens of *Culex quinquefasciatus*, and Rodrigo Sportello for helping with the figures.

REFERENCES

1 ALENCAR J., LOROSA ES., DÉGALLIER N, SERRA-FREIRE NM., PACHECO JB., GUIMARÃES AE. Feeding patterns of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *J. Med. Entomol.*, 2005, 42, 981-5.

2 APPERSON CS., HARRISON BA., UNNASCH TR., HASSAN HK., IRBY WS., SAVAGE HM., ASPEN SE., WATSON DW., RUEDA LM., ENGBER BR., NASCI RS. Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes. *J. Med. Entomol.*, 2002, 39, 777-85.

3 ASCHKAR SM., SENHORINI IL., RIBEIRO OG., CARRIERI ML., CERETTA RS., CONSALES CA. Immunopathology of rabies infection in lines of mice selected for high or low acute inflammatory reaction. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2007, 13, 39-55.

4 BEIER JC., 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.

5 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.

6 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.

7 GINGRICH JB., WILLIANS GM. Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware, 2001-2002. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 2005, 221, 194-200.

8 MARASSÁ AM., CONSALES CA., GALATI EAB. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2004, 37, 441-6.

9 MARASSÁ AM., CONSALES CA., GALATI EAB. Blood meal identification in *Nyssomyia intermedia* and *N. neivai* (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Region, São Paulo State, Brazil. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 2005, 82, 128.

10 MARASSÁ AM., CONSALES CA., GALATI EAB., NUNES VLB. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi* Galati & Nunes 1999 pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2006, 39, 183-6.

11 NIEBYLSKI ML., MEEK CL. Blood-feeding of *Culex* mosquitoes in an urban environment. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 1992, 8, 173-7.

12 NIEBYISKI ML., SAVAGE HM., NASCI RS., GEORGE B., CRAIG JR. Blood hosts of *Aedes albopictus* in the United States. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 1993, 10, 447-50.

13 PORSTMANN T., KIESSIG ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J. Immunol. Methods*, 1992, 150, 5-21.

14 SAMUEL PP., ARUNACHALAM N., HIRIYAN V., THENMOZHI V., GAJANANA A., SATYANARAYANA K. Host-feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* Say and *Mansonia annulifera* (Theobald) (Diptera:Culicidae), the major vectors of filariasis in a rural area of South India. *J. Med. Entomol.*, 2004, 41, 442-6.

15 SERVICE MW. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of blood-meals of haemathophagous insects. *Bull. Entomol. Res.*, 1986, 76, 321-30.

16 VAN DEN HURK AF., JOHANSEN CA., ZBOROWSKI P., PARU R., FOLEY PN., BEEBE NW., MACKENZIE JS., RITCHIE SA. Mosquito host-feeding patterns and implications for Japanese encephalitis virus transmission in northern Australia and Papua New Guinea. *Med. Vet. Entomol.*, 2003, 17, 403-11.

17 VASSÃO RC., CONSALES CA., SANT'ANNA OA., PEREIRA CA. Antibody responsiveness during immunization and challenge of genetically modified antibody responder mice with murine hepatitis virus. *Immunobiology*, 2003, 207, 1-9.

18 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 humans and birds. *J. Insect. Sci.,* 2004, 4, 1-3.

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