

Identificação do sangue ingerido, utilizando a técnica de ELISA, por fêmeas de *Aedes scapularis* do Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Estado de São Paulo.

Elaine Cristina Vicentin

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

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum*



São Paulo

2007

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

49070|2007 doc

Aos meus pais, Osmar e Carmita,
com todo o meu amor e carinho.

Aos meus irmãos, com muito amor.

Ao meu noivo, Willian, por toda
paciência, companheirismo e
amor.

AGRADECIMENTOS

À querida professora Dra. Maria Anice Mureb Sallum pela orientação e por acreditar no meu trabalho.

Às amigas Dra. Maria Stela Branquinho, Thais Crivelaro e Priscila Amaro pela solidariedade, pelo auxílio na realização dos testes e pela amizade sincera.

Ao Gabriel Zorello Laporta pela coleta, identificação e acondicionamento dos mosquitos.

À Dra. Regiane Maria Tironi de Menezes, pelas orientações estatísticas.

Ao Prof. Dr. Délsio Natal pela ajuda sempre oferecida.

À Dra. Roseli Tuan, chefe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular/SUCEN, por colocar-me à disposição a infra-estrutura laboratorial.

Ao químico Kleber J. Whitaker pela ajuda sempre que solicitada.

Aos amigos Daniel Varela e Daniela Botti pelo incentivo e por todas as conversas.

À Superintendência de Controle de Endemias-SUCEN representada pelo Superintendente Dr. Affonso Viviani Junior e pelo Chefe de Gabinete Dr. Osmar Mikio Moriwaki

pelo fornecimento do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica, onde realizei todos os testes.

Aos Professores Doutores do Depto. de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo por toda a colaboração a esse trabalho.

"Creio firmemente que a ciência e a paz
triunfarão sobre a ignorância e a guerra.

E que os povos se entenderão não para
destruir mas para edificar".

L. Pasteur

RESUMO

Vicentin EC. **Identificação do sangue ingerido, utilizando a técnica de ELISA, por fêmeas de *Aedes scapularis* do Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Estado de São Paulo.** [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública-USP; 2007.

A Febre do Nilo Ocidental é doença emergente em diversas regiões do mundo. O agente etiológico é vírus da família Flaviviridae que infecta aves, eqüinos e, acidentalmente, o homem. No Brasil o vírus não foi encontrado até o momento, entretanto, vem sendo realizada a vigilância epidemiológica com vistas à detecção precoce da presença do agente viral no país. O conhecimento do hábito alimentar dos mosquitos é importante para estudos em Saúde Pública, pois indica a potencialidade desses organismos para veicular agentes infecciosos que podem causar doenças. Assim, o uso do teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) indireto para a identificação do sangue ingerido por fêmeas de culicídeos é ferramenta importante para a definição e discussão do hábito alimentar das espécies. O objetivo do estudo foi investigar o sangue ingerido por fêmeas de *Aedes scapularis* capturadas no Parque Ecológico do Tietê (PET), situado na região metropolitana da Grande São Paulo. O PET apresenta diversos ambientes que são adequados a

múltiplas espécies de mosquitos. As coletas foram realizadas, mensalmente, no período de junho de 2005 a junho de 2006. Nas coletas, foram utilizados aspiradores de Nasci, movidos à bateria. Foram escolhidas 04 áreas do PET. Esses locais foram determinados com base em estudos anteriores. Dessa maneira, foi possível escolher os ambientes que apresentavam maior probabilidade de encontro de *Aedes scapularis*. Foram coletadas 843 fêmeas de *Aedes scapularis*. Dentre os insetos testados, os resultados obtidos foram: 67/336 (19,94%) positivos para homem; 20/336 (5,95%) positivos para aves; 129/336 (38,39%) positivos para cão, 17/336 (5,06%) positivos para rato, além de 103/336 (30,66%) positivos para repastos múltiplos. A baixa positividade para ingestão de sangue de rato e de aves aponta o possível envolvimento de outros hospedeiros como fonte alimentar. Os resultados para o repasto múltiplo demonstram que os mosquitos alimentam-se do sangue de vários hospedeiros antes de realizar a oviposição.

SUMMARY

Vicentin EC. Identification of blood ingested by the females of *Aedes scapularis* from the Tietê Ecological Park, São Paulo City, State of São Paulo, using the ELISA method. [Master degree work]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública; 2007.

The West Nile Fever is an emergent disease in several regions of the world. The etiologic agent is the virus from the Flaviviridae family which infected birds, equines and, accidentally, the man. The virus has not been found in Brazil so far; however the epidemiologic vigilance has been made to detect the premature presence from the virus agent in the country. The knowledge about the mosquitoes alimentary habits is important for the studies in Public Health, since it indicates the potentiality of these organisms to run infectious agents that can cause illness. Then, the use of the indirect ELISA method (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) for the identification of the ingested blood by the females culicidae is an important tool to the definition and discussion of the mosquito alimentary habit. The

purpose of the study was to investigate the ingested blood by females from *Aedes scapularis* captured in the Ecological Park of the Tietê (EPT), localized in the metropolitan area from São Paulo city. The EPT exhibits many regions which are suitable for multiple species of mosquitoes. Collections were held monthly during June 2005 to June 2006. The collections were done through Nasci's aspirators battery-operated. It was choose 04 areas in the EPT. These locations were determined in previous studies. In this manner, it was possible to choose the ambiances which featured by the highest probability of presence from *Aedes scapularis*. From the analyzed insects, the obtained results had been: 67/336 (19,94) positive ones for man; 20/336 (5,95) positive ones for birds; 129/336 (38,39) positive ones for dog, 17/336 (5,06) positive ones for rat, beyond 103/336 (30,66) positive for multiple feed. The low positive rate for ingestion of blood of rat and birds points the possible involvement of other hosts as alimentary source. The results for the multiple feed indicate that mosquitoes feed from blood of many hosts before to achieve the oviposition.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 FEBRE DO NILO OCIDENTAL	21
1.2 DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA PELO MUNDO	22
1.3 ASPECTOS ENTOMOLÓGICOS	25
1.4 ASPECTOS CLÍNICOS	27
1.5 ASPECTOS ECOLÓGICOS	30
1.6 VETORES	31
1.6.1 <i>Aedes scapularis</i>	32
1.7 VIGILÂNCIA	37
1.8 OUTROS ARBOVÍRUS	40
1.9 TÉCNICAS IMUNOENZIMÁTICAS	42
1.9.1 O teste ELISA	43
1.9.1.1 Método Indireto	47
1.10 TESTE PARA A DETERMINAÇÃO DE FONTE ALIMENTAR	48
2 JUSTIFICATIVA	51
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 ÁREA DE ESTUDO	57

4.2 CLIMA.....	66
4.3 AS MIGRAÇÕES.....	67
4.4 PRINCIPAIS ESPÉCIES MIGRATÓRIAS OCORRENTES NO BRASIL.....	69
4.4.1 Espécies Provenientes do Hemisfério Norte...	69
4.4.2 Espécies Provenientes do Hemisfério Sul.....	71
4.5 LOCAIS DE COLETA NO PET.....	72
4.6 OBTENÇÃO, ACONDICIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS <i>Aedes scapularis</i>	76
4.7 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA ELISA.....	78
4.8 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA ELISA INDIRETO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE SANGUE INGERIDO.....	79
4.9 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO HUMANO PARA REPASTO SANGUÍNEO.....	80
4.10 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO GALINHA PARA REPASTO SANGUÍNEO.....	82
4.11 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO CÃO PARA REPASTO SANGUÍNEO.....	83
4.12 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO RATO PARA REPASTO SANGUÍNEO.....	85
4.13 LIMIAR DE REATIVIDADE.....	86
4.14 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE DIGESTÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE POSITIVIDADE DO TESTE ELISA.....	87
4.15 VOLUME DE SANGUE E SENSIBILIDADE DO TESTE ELISA....	88
4.16 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	89

5. RESULTADOS	91
6. DISCUSSÃO	100
7. CONCLUSÃO	109
8. REFERÊNCIAS	111

LISTA DOS REAGENTES EMPREGADOS

Anti-soro humano: Affinity Purified Antibody to Human IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.;

Anti-soro galinha: Affinity Purified Antibody to Chicken IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.;

Anti-soro cão: Affinity Purified Antibody to Dog IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.;

Anti-soro rato: Affinity Purified Antibody to Rat IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.;

Conjugado peroxidase humano: Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody to Human IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.;

Conjugado peroxidase galinha: Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody to Chicken IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.;

Conjugado peroxidase cão: Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody to Dog IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.;

Conjugado peroxidase rato: Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody to Rat IgG (H+L), produced in goat, KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md;

Glicerol - Sigma G-7893;

Placas COSTAR 2797, COSTAR, Cambridge, MA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fêmea de *Aedes scapularis* durante repasto sangüíneo.

Figura 2: Mapa de localização do Parque Ecológico do Tietê.

Figura 3: Fachada do Centro de Recepção de Animais Silvestres (C.R.A.S.).

Figura 4: Quatis do Parque Ecológico do Tietê.

Figura 5: Bugio do C.R.A.S.

Figura 6: Ave silvestre C.R.A.S.

Figura 7: Ponto de coleta 1.

Figura 8: Ponto de coleta 2.

Figura 9: Ponto de coleta 3.

Figura 10: Ponto de coleta 4.

Figura 11: Aspirador segundo modelo descrito por Nasci.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do teste ELISA para repasto sanguíneo em fêmeas de *Aedes scapularis* coletados no Parque Ecológico do Tietê, SP.

Tabela 2: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no Parque Ecológico do Tietê, SP.

Tabela 3: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no ponto 1 e no ponto 2 do Parque Ecológico do Tietê, SP.

Tabela 4: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no ponto 1 e no ponto 3 do Parque Ecológico do Tietê, SP.

Tabela 5: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no ponto 2 e no ponto 3 do Parque Ecológico do Tietê, SP.

Tabela 6: Resultados do teste ELISA para repasto sanguíneo homem, cão e repasto misto em *Aedes scapularis* coletados no Parque Ecológico do Tietê, SP.

Siglas Utilizadas

ABTS - [2,2'-azino-di(3-ethyl-benzthiazolinesulphonate) - peroxidase substrate solution]

APA - Área de proteção ambiental

BSA - Albumina do soro bovino

CCZ - Centro de Controle de Zoonoses

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo

ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IgG - Imunoglobulina M

IgM - Imunoglobulina G

µl - Microlitro

MS - Ministério da Saúde

nm - Nanômetro

PBS - phosphate-buffered saline

PET - Parque Ecológico do Tietê

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias

VNO - Virus do Nilo Ocidental

1. INTRODUÇÃO

1.1 A FEBRE DO NILO OCIDENTAL

A Febre do Nilo Ocidental é enfermidade emergente em diversas regiões do mundo. Desde a década de 1990, ocorrem epidemias na Argélia (1994), Romênia (1996-1997), República Checa (1997), República Democrática do Congo (1998), Rússia (1999), Estados Unidos da América (1999) e Israel (2000) (TAMAYO, 2004). A doença é causada pelo vírus do Nilo Ocidental (VNO) que pertence ao gênero *Flavivirus* (NATAL et al., 2004) da família *Flaviviridae*.

O diagnóstico de VNO pode ser feito de forma direta ou indireta. O diagnóstico de forma direta inicia-se na cultura de células de hospedeiro ou do vetor. Para hospedeiros humanos ou eqüinos, o isolamento pode ser feito a partir do tecido cerebral ou amostra de sangue e, no caso de aves, pode ser feito a partir de amostras de cérebro, coração e rim, além de sangue. Em mosquitos, o vírus é isolado de macerado de indivíduos e evidenciado pela técnica de imunofluorescência (CDC, 2001). É possível realizar sorologia pela detecção de anticorpos neutralizantes contra o VNO em testes de neutralização em camundongos ou em célula a partir de soros humanos, ave e

cavalos. Pode-se ainda utilizar a inibição de hemaglutinação ou teste imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos das classes IgM e IgG (CDC, 2001).

1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL

Após o isolamento em Uganda em 1937, o VNO foi detectado na África, Mediterrâneo Oriental, partes da Europa e da antiga União Soviética, Índia e Indonésia (WORK et al., 1955; TAYLOR et al., 1956; MONATH, 1990 citados por NATAL & UENO, 2004).

Nas Américas, a doença foi registrada pela primeira vez em 1999, na cidade de Nova Iorque, E.U.A. Em 2001 ocorreram 66 casos de Febre do Nilo Ocidental em dez Estados Norte-Americanos e em 2002, houve aumento significativo da incidência que atingiu 4.161 casos, em 44 Estados, com 277 óbitos (TAMAYO, 2004).

No período entre janeiro de 2004 e janeiro de 2005, foram registrados 2.470 casos humanos. Desse total, 5% evoluíram para óbito, 36%, para doenças neurológicas

graves tais como meningite e encefalite, 41% apresentaram febre e 22%, outros sintomas. Embora as medidas de controle adotadas pelo governo americano sejam, em geral, eficazes para as doenças emergentes, casos de infecção pelo VNO foram reportados em todos os Estados (CDC, 2005).

Desde o primeiro registro da presença do VNO nos EUA, vem-se observando a sua rápida expansão pela América do Norte - do Atlântico à costa do Pacífico (PETERSEN et al., 2003) e do Canadá (BUCK et al., 2003) até o Caribe (DUPUIS et al., 2003; KOMAR et al., 2003) e pela América tropical, onde em 2003, o vírus foi registrado em Baja, México (REISEN et al., 2004; IBAMA 2006).

A presença de aves migratórias e residentes, soropositivas para o VNO, foi registrada ao longo do Atlântico e Mississippi. Essas aves migram para o Caribe (KOMAR et al., 2003) e leste tropical do México (ESTADAFRANCO et al., 2003), provocando a dispersão do vírus (REISEN et al., 2004).

No México, o avanço do vírus não repercutiu com o mesmo impacto verificado nos Estados Unidos, ocorrendo número menor de casos humanos e em animais. Esse fenômeno levou os cientistas a sugerirem que infecções prévias por

outros flavivírus podem ter servido de barreira imunitária, que impediu a manifestação clínica do agravo (NATAL et al., 2004). Por razões desconhecidas, aves encontradas mortas pela infecção do VNO ocorreram somente nos Estados Unidos, Israel, Canadá e México (CDC, 2004).

No Brasil, não foi registrada até o momento a circulação do VNO. Entretanto, vem sendo realizada vigilância epidemiológica com vistas à detecção precoce do agente infeccioso. O fato do Brasil deter o segundo lugar em biodiversidade de aves do planeta e a existência de diversas espécies que desenvolvem rotas migratórias entre o norte e o sul do continente passando pelo país assinalam o potencial de estabelecimento dessa virose na região. Nesse sentido, o Ministério da Saúde (MS), em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, tem realizado inquéritos sorológicos em aves migratórias provenientes de áreas de ocorrência do VNO (ARAÚJO et al. 2004a, b).

Vários fatores são necessários para que a infecção ganhe efetivamente novos territórios: a chegada de aves migratórias apresentando alta viremia, a presença de mosquitos vetores competentes transmitir o vírus em elevada

densidade, a amplificação do vírus tanto nas aves como nos vetores e a transmissão do agente infeccioso para cavalos ou humanos (NATAL & UENO, 2004).

1.3 ASPECTOS ENTOMOLÓGICOS

Arbovírus são vírus mantidos na natureza através da transmissão biológica, que ocorre entre vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos. A transmissão ocorre quando um inseto hematófago se alimenta do sangue de animal vertebrado infectado, em período de viremia. O inseto pode então se infectar e ao picar hospedeiro susceptível, transmite o vírus para esse organismo. Os ciclos de transmissão dependem tanto das espécies de vertebrados como de insetos que estão envolvidas, e também do vírus. O termo arbovírus tem origem de **AR**thropd **BO**rn **VIRUS** (ARBOVIRUS) (CDC, 2006), ou seja vírus transmitidos por artrópodos.

As encefalites provocadas por arbovírus são zoonoses que têm ciclo de transmissão complexo que pode envolver múltiplos hospedeiros vertebrados e artrópodes. Os

ciclos de transmissão de zoonoses, geralmente, permanecem indetectáveis até o homem invadir o ambiente natural, ou o vírus se dispersar através de insetos vetores que habitam tanto o ambiente silvestre como o rural ou urbano. O homem e os animais podem também ser infectados em locais que sofreram mudanças ecológicas. Nesse caso, o vírus é veiculado por espécies de mosquitos adaptadas aos ambientes alterados pelo homem. Os seres humanos e os animais domésticos podem desenvolver a doença clínica e, geralmente, são hospedeiros acidentais por não produzirem viremia significativa. Assim, não contribuem para a transmissão do vírus (CDC, 2006).

Segundo ZENAID et al (2004) foram constatadas outras vias de transmissão em humanos, embora sejam eventos mais raros. Entre elas, vale assinalar os transplantes de rins, pulmões e coração, transfusão de componentes sanguíneos, amamentação, passagem transplacentária durante o parto, entre outras.

As arboviroses podem ser prevenidas de duas maneiras:

1. Proteção pessoal para reduzir o contato com mosquitos e

2. Medidas de saúde pública para reduzir populações de mosquitos infectados (CDC, 2006).

As medidas de proteção pessoal incluem: reduzir o tempo ao ar livre, particularmente, ao amanhecer e ao entardecer; calças e camisas de mangas compridas e aplicar repelente nas áreas expostas do corpo. As medidas de saúde pública incluem: a eliminação de criadouros e a aplicação de inseticidas. A combinação dos métodos de controle dos mosquitos depende muito da época do ano, da espécie a ser controlada e do habitat. Em situações de emergência, a pulverização da área em larga escala é utilizada para reduzir rapidamente o número de mosquitos adultos (CDC, 2006).

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS

As aves são hospedeiros naturais de múltiplos vírus. Mesmo quando infectadas, esses animais apresentam ou não os sintomas da infecção. Alguns casos podem evoluir para a morte. Humanos e cavalos são considerados

hospedeiros terminais do VNO, pois não desenvolvem viremia suficiente para infectar o vetor (NATAL et al., 2004).

A infecção pelo VNO em cavalos provoca ataxia, debilidade das extremidades, contrações musculares repentinas e febre. Evoluem para quadros graves e óbito em cerca de 24% dos indivíduos infectados, somando-se tanto os animais falecidos como os sacrificados (NATAL et al., 2004).

Nos Estados Unidos, há uma vacina para cavalos em duas doses, que são administradas em intervalos de três a seis semanas, com reforço anual. Nos animais vacinados, os anticorpos neutralizantes de IgM surgirão no sangue logo após a segunda dose.

No homem, o período de incubação do vírus da Febre do Nilo Ocidental é de três a quinze dias. A maioria das infecções em humanos é assintomática, ao redor de 80%. Na forma clássica da doença, representando aproximadamente 20% das infecções, a manifestação clínica é semelhante à da dengue, ao apresentar febre, dor de cabeça, erupção na pele, entre outras. Na forma severa, que representa cerca de 1% das infecções e 37% dos casos clínicos, manifesta-se como encefalite, meningite, meningoencefalite, com

debilidade muscular, havendo casos de paralisia flácida aguda, e, raramente, como hepatite, pancreatite e miocardite. As encefalites são mais comuns em pessoas com mais de 50 anos, cuja letalidade é por volta de 10% (NATAL et al., 2004).

Segundo ANGELO (2006), o vírus da Febre do Nilo Ocidental reproduz-se no espaço entre as células do cérebro e as invade após a replicação, levando à desintegração de neurônios e despertando células do sistema de defesa do corpo para atacar o cérebro na tentativa de livrá-lo do agente etiológico. Isso causa lesões em pontos tão diversos e sensíveis quanto o córtex cerebral, a medula e o cerebelo.

Até o momento não se dispõem de tratamento específico nem vacina eficaz para os humanos. Segundo TESH et al. (2002), há inúmeras tentativas de elaboração de vacina, ainda em fase experimental.

Nos casos severos, a internação é obrigatória, devido à necessidade de terapia intensiva, reposição de líquido intravenoso, manejo das vias aéreas, prevenção de infecções secundárias, entre outras medidas (NATAL et al., 2004).

1.5 ASPECTOS ECOLÓGICOS

O VNO possui ampla valência ecológica, podendo infectar vetores e animais de diferentes táxons (BERNARD et al., 2001). Dispersa-se, principalmente, por meio de aves em suas rotas migratórias (NATAL et al., 2004).

Alguns autores admitem a existência de vetores intermediários que, adaptados aos ambientes de transição entre os naturais e os antrópicos, funcionariam como "vetores-pontes" ao trazerem o VNO dos ciclos silvestres para as áreas mais habitadas (SARDELIS et al., 2002; KUTZ et al., 2003). Tais mosquitos apresentariam comportamento eclético em relação ao ambiente onde vivem e, conseqüentemente, às fontes de repasto sangüíneo (NATAL et al., 2004).

1.6 VETORES

Segundo NATAL et al. (2004), para que determinada espécie de mosquito atue como vetor do VNO há alguns requisitos, como:

- Abundância: há a necessidade da presença intensa de exemplares adultos no ambiente, permitindo que indivíduos da população sejam infectados em uma fonte, representada por vertebrado virêmico;

- Competência: o agente viral tem afinidade pelo organismo do vetor. Este, ao praticar a hematofagia, em vertebrado virêmico, ingere partículas virais, podendo se infectar. O vírus replica-se com eficiência nos tecidos do vetor, infecta a hemolinfa, diversos órgãos do inseto, podendo atingir as células das glândulas salivares. Assim ocorrendo, o vírus poderá ser transmitido pela saliva do inseto a outro hospedeiro susceptível, durante a hematofagia.

- Longevidade: o mosquito deve sobreviver o suficiente para processar vários repastos sanguíneos. A longevidade do inseto poderá garantir o contato do mesmo

com diversos hospedeiros, aumentando as chances de transmissão do parasita;

- Zoofilia: o mosquito terá que se alimentar do sangue de aves infectadas em período de viremia para a manutenção de ciclos silvestres e de mamíferos, nas transmissões acidentais envolvendo cavalos e homens.

Muitos mosquitos já foram encontrados infectados com o VNO (NASCI et al., 2001). Os gêneros *Aedes* e *Culex* têm tido relação com o vírus em diversas áreas nas Américas, onde a arbovirose foi registrada. Entre outras possibilidades, no Brasil, *Aedes scapularis*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* são as espécies que, em certas situações, poderão atuar como vetores eficiente de VNO, caso o organismo seja introduzido (NATAL et al., 2004).

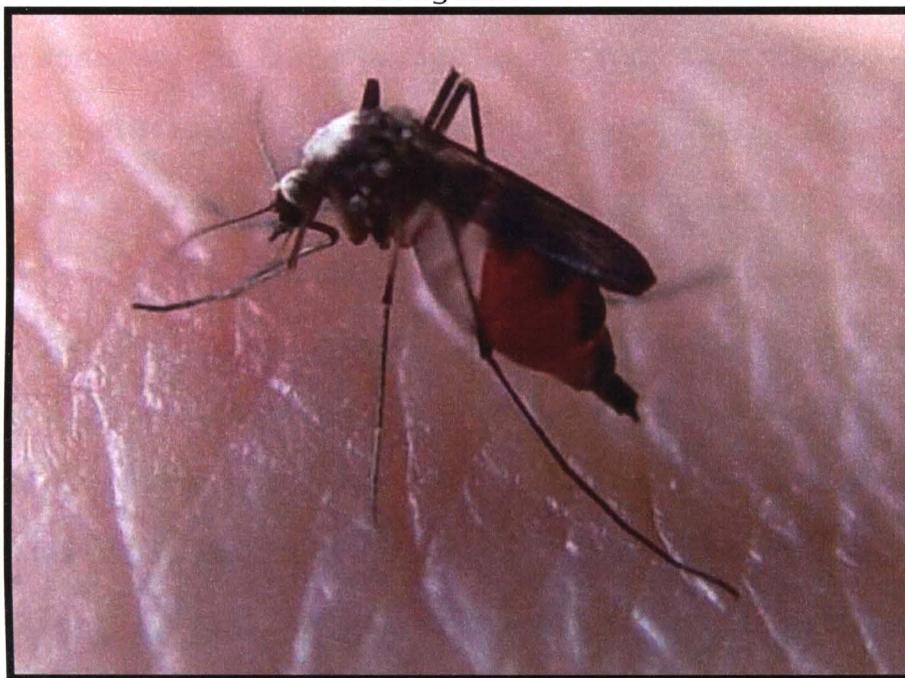
1.6.1 *Aedes scapularis*

O *Aedes scapularis* (RONDANI, 1848) é mosquito abundante na América do Sul. É encontrado do norte da

Argentina até a Colômbia e em Trinidad e Tobago. Na América Central ocorre da Costa Rica ao México, nas Grandes Antilhas, Bahamas e Sul dos EUA (Texas) (ARNELL, 1976). No Brasil, essa espécie foi registrada em todos os Estados (CONSOLI E LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

As formas imaturas de *Ae. scapularis* se desenvolvem em criadouros no solo, de caráter transitório. Preferem as coleções hídricas naturais, como poças d'água e alagados, mas são encontradas, também, em criadouros artificiais, como valas de drenagem, impressões de pneus e de patas de animais no solo. Tais criadouros são geralmente de pouca profundidade e muita luminosidade, podendo ser destituídos de vegetação. Porém, freqüentemente, apresentam vegetação emergente (gramíneas), que os tornam parcialmente sombreados (CONSOLI E LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Figura 1 - Fêmea de *Aedes scapularis* durante repasto sangüíneo



Extraído de: KOBAYASHI KM, 2003.

Apesar desse aedine ter como característica o desenvolvimento em criadouros no solo, SILVA e MENEZES (1996) encontraram duas larvas em lata abandonada a margem de uma rodovia e FORATTINI et al., (1997) também descreveram o encontro de larvas de *Ae. scapularis* em recipientes artificiais no município de Ilha Comprida e Pariquera-Açu, no Estado de São Paulo.

A densidade de *Ae. scapularis* em determinada localidade pode ser direta e positivamente influenciada

pelas chuvas. É um mosquito de ocorrência anual e com densidade elevada na estação quente-chuvosa causando grande perturbação aos animais e ao homem (CONSOLI E LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

É espécie eclética e oportunista quanto ao hospedeiro. Ataca o homem com muita voracidade, mas pode atacar mamíferos de grande porte com maior intensidade. Quando a quantidade de *Ae. scapularis* alimentando-se em bovinos e eqüinos é comparada com a obtida em homem, numa mesma ocasião, verifica-se que aqueles são muito mais picados do que este (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & HEYDEN, 1986)

Segundo Consoli e Lourenço de Oliveira (1994), essa espécie é mais freqüente nas matas secundárias e no ambiente extradomiciliar (até mesmo no peridomicílio) do que no domicílio. Vale assinalar que o *Ae. scapularis* pode ser encontrado, em número considerável, no ambiente domiciliar, em certas localidades do sudeste brasileiro, como por exemplo o Estado de São Paulo e Paraná.

Ae. scapularis foi considerado como possível transmissor do vírus Rocio, que causou epidemias no sudeste de São Paulo, em 1975 e 1976. Durante a epidemia, este Aedini foi um dos mosquitos mais abundantes nas áreas

atingidas, mas não foi achado naturalmente infectado com o vírus. Esse inseto é vetor competente do vírus Rocio em condições de laboratório (FORATTINI et al., 1978a, b; MITCHELL & FORATTINI, 1984; MITCHELL et al., 1986 citados por CONSOLI E LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Ainda na Região Sudeste, o *Ae. scapularis* foi encontrado infectado por *Flavivirus* não identificado, porém, diferente daqueles da febre amarela e dengue. Outros arbovírus têm sido isolados desse mosquito em condições naturais, no norte do Brasil e em Trinidad (FORATTINI, 1965; ARNELL, 1976; HERVÉ et al., 1986 citados por CONSOLI E LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Na década de 1950, o *Ae. scapularis* foi considerado vetor local da *Wuchereria bancrofti* em inquéritos realizados em Santa Catarina. Exemplos desta espécie foram encontrados albergando larvas infectantes desse helminto, No entanto, tratava-se de área com endemicidade elevada desta filariose mantida especialmente pelo vetor primário o *Cx. quinquefasciatus*. Dessa maneira, consideram-se que o *Ae. scapularis* possa ter se infectado apenas de forma ocasional e ser vetor extraordinário desse

invertebrado (RACHOU, 1956 citado por CONSOLI E LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

1.7 VIGILÂNCIA

A vigilância do VNO é complexa. Preconiza-se a organização de rede que envolva a obtenção de dados sobre a atividade viral nos seguintes organismos: em humanos, em cavalos, em aves e em vetores (HANDLER et al., 2001).

Segundo NATAL et al. (2004), a vigilância epidemiológica deve ser intensa até que surja o primeiro caso humano. A partir desse evento, deve-se implantar vigilância sanitária ativa que envolve a procura das ocorrências. Essa será útil para documentar o impacto na Saúde Pública, mas não deve ser utilizada como modo de prevenção, pois ao detectar-se os casos, o episódio já está em curso. Na Argentina, segundo dados do Instituto Nacional de Enfermidades Virais Humana (INEVH), com o objetivo de investigar se o vírus já havia atingido o homem, analisou-se o soro de pacientes, cujos quadros foram diagnosticados como síndrome febril inespecífica, ocorridas entre 1977 e

1999. Porém, as amostras que foram positivas para flavivírus, enviadas ao CDC nos EUA, foram testadas para VNO e os resultados foram negativos. Entretanto, em abril de 2006, na Argentina, foram detectados os primeiros três casos de VNO. As amostras foram obtidas em três cavalos na Província de Buenos Aires (INFORMACIONES SANITARIAS, 2006).

No Brasil, a vigilância das meningites virais terá um diferencial para o diagnóstico do VNO. Será levado a efeito em pacientes com quadro característico, que tenham idade acima de 50 anos e história de viagem para áreas de risco nos últimos 15 dias. A estratégia da vigilância em cavalos é muito similar à humana. Na epidemia de Nova York (EUA), casos em eqüinos precederam casos humanos, mas na Florida (EUA), o mesmo não se sucedeu e, logicamente, esses padrões variam segundo o ambiente (NATAL et al., 2004).

NATAL et al. (2004) afirmam ainda que no Brasil, a vigilância da doença em cavalos será realizada a partir de animais que adoecerem e morrerem suspeitos de encefalite rábica e que sejam laboratorialmente negativos. O material coletado será encaminhado para diagnóstico das encefalites eqüinas e, caso também tenham resultado negativo, serão encaminhados para estudo de verificação de VNO.

Nas aves, a atividade principal recai sobre a educação, estimulando a população a compartilhar da vigilância. Nesse sentido, as aves encontradas mortas devem ser levadas a um laboratório para diagnóstico (BLACKMORE et al., 2003).

Em países como os da América do Sul, para onde o vírus ainda não se expandiu, há preocupação com o fluxo migratório das aves. Assim, no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) delimitou os principais pontos de passagem das aves, onde elegeram locais estratégicos para a vigilância. As aves são aprisionadas com rede, das quais se extraem amostras para encaminhamento de pesquisa virológica (ARAÚJO et al., 2004a, b). Não foi detectada a presença de anticorpos de VNO em grande número e diversidade de espécies analisadas, porém foram identificados outros vírus de importância epidemiológica. A vigilância em aves, em implantação no Brasil, dar-se-á a partir de indivíduos mortos encontrados em zoológicos, parques e praças das cidades. Essa estratégia contará com os Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) como bases operacionais para o desenvolvimento das atividades. Em relação aos vetores, a vigilância deverá concentrar-se na identificação de

espécies com potencial de transmissão, bem como na detecção de mosquitos infectados com o VNO. Há a necessidade de monitoramento da população de mosquitos, elegendo-se pontos de captura, mediante o uso de armadilhas automáticas, coletas em animais envolvidos na cadeia epidemiológica, entre outras alternativas. No Brasil, o combate de vetores será realizado de forma integrada com os programas de controle de *Aedes* (dengue) e de *Anopheles* (malária) e contará com o apoio dos laboratórios de entomologia das Secretarias Estaduais de Saúde. Essa é vista como uma maneira de otimizar os recursos já existentes. O MS já organizou e implementou rede de vigilância em pontos vulneráveis do território, associados naturalmente a ecossistemas utilizados nas rotas de aves procedentes das América do Norte e Central (NATAL et al., 2004).

1.8 OUTROS ARBOVÍRUS

O interesse no conhecimento dos arbovírus e das infecções por eles causadas, no Estado de São Paulo,

acentuou-se com a ocorrência de epidemia de encefalite, causada pelo vírus Rocio (ROC) na década de 70, na região do Vale do Ribeira. Tratavam-se dos primeiros casos de doença humana autóctone, causada por esses agentes etiológicos no Estado, desde a ocorrência de febre amarela na década de 50. Diversos arbovírus, alguns patogênicos para o homem, foram isolados naquela região durante a epidemia e em anos posteriores. Estudos soroepidemiológicos mostraram circulação também na população humana de arbovírus sabidamente patogênicos, como bunyavírus Caraparu, flavivírus ROC, Bussuquara, Ilhéus, da febre amarela e da encefalite de St. Louis e alfavírus causadores das encefalites eqüinas do leste, do oeste e venezuelana. A transmissão urbana dos vírus ROC e Caraparu foi sugerida pela presença de anticorpos para esses agentes, verificada em soros escolares residentes em zona urbana na região, sem hábito freqüente a ambiente silvestre (ROMANO-LIEBER & IVERSSON, 2000).

PEREIRA et al. (2001), durante a realização de um programa de vigilância ecoepidemiológica de arbovírus no Parque Ecológico do Tietê, isolaram o vírus Ilhéus (ILH) de aves silvestres capturadas na área preservada do parque.

O isolamento do vírus Ilhéus e a detecção de anticorpos específicos em aves residentes, migratórias e de cativeiro, em sagüis e quatis, comprovam a presença desse agente no Parque Ecológico do Tietê. O comportamento migratório de aves silvestres pode determinar a introdução do vírus em outras regiões. Considerando-se a patogenicidade para o homem e a confirmação da circulação desse agente viral em área urbana, freqüentada para atividade de lazer e educação, o risco de ocorrência de infecção na população humana não pode ser descartado (PEREIRA et al., 2001).

1.9 TÉCNICAS IMUNOENZIMÁTICAS

As técnicas imunoenzimáticas são baseadas na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas que permitem a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. Vários métodos imunoenzimáticos foram desenvolvidos, a saber: a) para a localização de constituintes celulares; b) para a medida de

pequenas quantidades de antígenos, haptenos e anticorpos; c) para a detecção de imunoprecipitados. Nestas técnicas, um dos fatores mais importantes é a eficiência do conjugado empregado e, conseqüentemente, a escolha de três componentes: anticorpo ou antígeno, enzima e processo de conjugação, cujas características, por sua vez, variam de acordo com a técnica empregada (FERREIRA & ÁVILA, 1996).

1.9.1 O teste ELISA

O termo ELISA foi utilizado pela primeira vez por Engvall e Perlmann em 1971 e identifica um ensaio heterogêneo diferente dos métodos enzimáticos até então utilizados, que envolviam coloração imuno-histoquímica pela técnica da imunoperoxidase. O conceito de enzimaensaio heterogêneo foi apresentado por Miles e Hales em 1968, mas o emprego de conjugados imunoenzimáticos em imunoenaios foi relatado, independentemente, por Engvall e Perlmann (1971) e por Van Weumen e Schuurs (1971). Este teste foi desenvolvido como alternativa ao radioensaio para a

detecção de antígenos e anticorpos (FERREIRA & ÁVILA, 1996).

O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo. A fase sólida pode ser constituída por partículas de agarose, poliacrilamida, dextran, poliestireno, etc. Placas plásticas são as mais difundidas por permitirem a realização de múltiplos ensaios e automação. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados. A amostra deve ser ensaiada na faixa de concentração em que a curva dose-resposta do teste ELISA tenha grande inclinação, ou seja, na região em que pouca variação na concentração resulta em grande aumento na densidade óptica. Para tanto, é necessário diluir a amostra. A adsorção não específica da amostra na placa pode ser reduzida incluindo-se um detergente não iônico, como o tween 20 e/ou proteína (leite desnatado, gelatina, BSA, caseína, etc.) no diluente da amostra. Os conjugados devem ser preparados com anticorpos

de alta afinidade e maximamente purificados. No método de conjugação, os diluentes e as condições de armazenamento podem influenciar no desempenho do conjugado. Os substratos cromogênicos empregados pela degradação enzimática dão origem a produtos solúveis coloridos, cuja determinação é feita medindo-se a densidade óptica da solução espectrofotometricamente. Para a peroxidase, o substrato é peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os cromógenos ou doadores de hidrogênio mais utilizados são ortofenilenodiamina (OPD), ácido 5-amino salicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico (ABTS) e tetrametilbenzidina (TMB). A escolha do cromógeno depende da preferência do laboratório, e a concentração ótima do substrato (H_2O_2) depende tanto do cromógeno empregado como da fase sólida, devendo ser estabelecida preliminarmente. Variações diárias nas condições do teste tornam necessária a correção dos valores das amostras em teste com relação a amostras de referência (FERREIRA & ÁVILA, 1996).

Segundo FERREIRA & ÁVILA (1996), o objetivo do ensaio é a quantificação ou verificação da presença de um antígeno ou anticorpo. No caso de antígenos bem definidos é possível se obter as concentrações em mg/ml. Para os

anticorpos, a quantificação é mais complexa, pois são heterogêneos quanto à sua afinidade e propriedades físico-químicas e são, geralmente, ensaiados em faixa de concentração mais ampla do que os antígenos. Além disso, a afinidade dos anticorpos varia com a concentração, sendo maior em amostras mais diluídas. Essas diferenças devem ser consideradas ao se expressarem os resultados, mas independentemente do método escolhido para relatá-los, é necessário determinar o limiar de reatividade "cut-off". Valores acima do limiar de reatividade são considerados positivos. Vários métodos podem ser utilizados para expressar os resultados obtidos no teste ELISA. Pelas características de elevada sensibilidade e especificidade, bem como de rapidez, baixo custo, objetividade de leitura e possibilidade de adaptação a diferentes graus de automação, o teste ELISA é empregado na detecção de antígenos ou anticorpos em um número muito grande de sistemas. Por se tratar de um ensaio heterogêneo, após cada etapa, como sensibilização, incubação com amostra e com conjugado, as cavidades das placas são lavadas para a remoção do material não ligado à fase sólida.

1.9.1.1 Método indireto

O método indireto tem sido amplamente empregado para a pesquisa de anticorpos, apresentando como vantagens a possibilidade de utilizar um único conjugado em diferentes sistemas e conjugados classe - específicos para a determinação de anticorpos de diferentes classes. No método básico, placas plásticas são sensibilizadas com antígeno que, após bloqueio, reage com a amostra. O conjugado antiimunoglobulina humana reage com o anticorpo capturado pelo antígeno e a reação é revelada com a solução cromógena. A reação é interrompida, e a intensidade de cor é estimada a olho nu ou fotometricamente. O grau de degradação do substrato, geralmente é indicado pela intensidade de cor da solução, é proporcional à concentração do anticorpo. Várias modificações podem ser feitas ao método básico. A) Se o antígeno não for suficientemente puro, um anticorpo específico pode ser ligado à fase sólida, seguido pelo antígeno bruto. Neste caso, é necessário que o anticorpo que sensibiliza a fase sólida não reaja com o conjugado. B) Após se colocar a

amostra, em vez de se incubar com o conjugado, pode-se colocar antiimunoglobulina não marcada e, após, o conjugado antiimunoglobulina. C) Em vez de conjugado enzimático com antiglobulina, pode-se utilizar proteína A marcada com enzima (FERREIRA & ÁVILA, 1996).

1.10 TESTE PARA A DETERMINAÇÃO DE FONTE ALIMENTAR

A identificação de hábitos alimentares de artrópodos hematófagos tem provado ser de grande utilidade no estudo da epidemiologia de artrópodos vetores de doenças (WEITZ, 1956, 1960; TEMPELIS, 1970, 1975; BOREHAM, 1972). Reveste-se ainda, de grande importância para a avaliação da capacidade vetora desses insetos bem como na escolha e aplicação de meios mais adequados de controle (FORATTINI et al. 1987).

Segundo BURKOT (1981) existem vários métodos para analisar hábitos alimentares, como precipitina, cristalização de hemoglobina, imunoflorescência, entre outros. As técnicas de precipitina provaram não ser muito

sensíveis e nem específicas. O método de cristalização de hemoglobina, proposto por WASHINO e ELSE (1972), embora específico, se mostrou duvidoso em identificar o sangue de animais com hemoglobina diluída e a precisão na identificação sofreu variações de acordo com a espécie de mosquito. A técnica de imunoflorescência requer sofisticados equipamentos e número limitado de identificação de fontes sangüíneas. A necessidade de um método de identificação que seja, ao mesmo tempo, específico, pelo menos ao nível genérico, e sensível o suficiente para testar múltiplos hospedeiros, tem levado pesquisadores a adotarem o teste ELISA. Resumidamente, o teste ELISA está sendo utilizado por ser mais sensível do que as técnicas de aglutinação, de precipitina e de imunoflorescência.

O ELISA possui a vantagem de ter alta sensibilidade e especificidade, além de utilizar quantidade pequena da amostra a, mesmo depois de 24 horas da ingestão do sangue (EDRISSIAN e HAFIZI, 1982).

A escolha da técnica depende dos objetivos da pesquisa (BEIER et al. 1988). O ELISA direto é um dos procedimentos mais simples e utiliza antisoros disponíveis

no mercado. Permite o processamento de grande número de exemplares, com relativa rapidez, sendo assim, útil para a investigação de antropofilia (EDRISSIAN et al. 1985). O ELISA indireto é técnica mais complexa, pois os soros devem ser produzidos para cada hospedeiro a ser testado. É o teste mais indicado quando é necessária informação para uma amplitude de hospedeiros silvestres, como em investigação do repasto sanguíneo (BEIER et al. 1988).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a escassez de publicações sobre repasto sanguíneo de *Aedes scapularis*, há necessidade premente de conhecimentos sobre possíveis associações entre hospedeiro e mosquito vetor. A identificação do repasto sanguíneo em mosquitos e em outros Diptera hematófagos é importante no estudo de agentes infecciosos transmitidos por artrópodos, como é o caso do VNO. Muitas técnicas sorológicas foram empregadas para detectar a presença de sangue-específico do hospedeiro no organismo de insetos vetores (WEITZ, 1960; TEMPELIS, 1975; WASHINO e TEMPELIS, 1983).

O *Aedes scapularis* está se tornando mosquito eusinantrópico, e a influência do homem é importante para a sua manutenção, oferecendo criadouros, abrigo ou fonte alimentar. A circulação do mosquito vetor entre ambientes alterados e silvestres poderá incluir o homem em ciclos de transmissão de agentes infecciosos.

Diante da possibilidade de introdução do VNO no Brasil, os conhecimentos sobre o repasto sanguíneo de *Aedes scapularis* será de importância para o desenvolvimento de estratégias de controle do VNO e também de outros agentes infecciosos.

A área escolhida para o desenvolvimento da pesquisa foi o Parque Ecológico do Tietê (PET). Este local está inserido na região metropolitana da cidade de São Paulo que representa o maior adensamento humano do país. O PET reúne condições ecológicas adequadas para a implantação do vírus do Nilo Ocidental. Além disso, o PET recebe anualmente aves migratórias de diversas regiões e possui grande variedade e quantidade de culicídeos com potencial para transmitir o vírus. Dessa maneira, é importante caracterizar o repasto sanguíneo das espécies de Culicidae que ocorrem no PET.

O presente estudo tem como característica, a aplicação do método imunoenzimático ELISA indireto para a determinação do sangue ingerido por mosquitos da espécie *Aedes scapularis*, presentes no PET.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o sangue ingerido por *Aedes scapularis*, capturados no Parque Ecológico do Tietê (PET), Guarulhos, SP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronizar a reação imunoenzimática, ELISA indireto, para determinação do sangue ingerido por *Aedes scapularis*;

2. Determinar o índice antropofílico e zoofílico para a população de *Aedes scapularis* do PET.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - CEP, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, sob o protocolo de nº. 1375, e por se tratar de uma pesquisa que não envolve diretamente seres humanos, não houve a necessidade de parecer do Comitê.

Foi também avaliado e aprovado pela Comissão Científica da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), sob o protocolo de nº. 15/05.

4.1 ÁREA DE ESTUDO

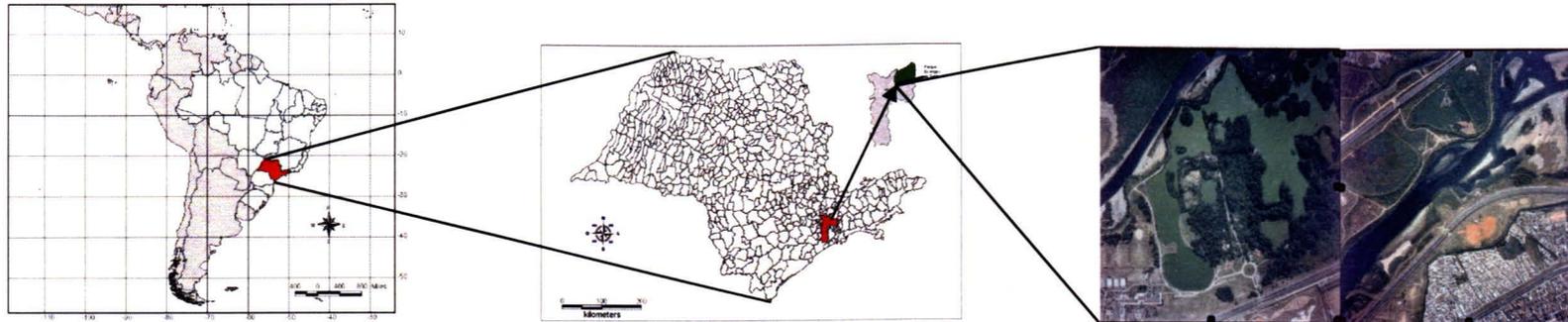
O Parque Ecológico do Tietê (PET), centro de Lazer Engenheiro Goulart, localiza-se aproximadamente a 23°25' de latitude sul e 46°28' de longitude oeste, município de Guarulhos, São Paulo. Foi criado pelo Decreto Municipal nº. 7868, de 30 de abril de 1976. A finalidade do PET, que está dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) Várzea do Tietê, é preservar áreas de várzeas do Rio Tietê, as terras às margens do rio e, também, colocar áreas de

lazer à disposição da comunidade. A primeira idéia de implantação do parque surgiu em 1975, em função do plano de correção do rio e também devido ao problema de inundações na Região Metropolitana da Grande São Paulo (ECOTIETÊ, 2006).

Os lagos preexistentes à instalação do PET, que surgiram da exploração de argilas, acrescidos de outros que seriam implantados, teriam por finalidade aspectos recreativos, estéticos, além de importantíssimo papel como regulador das cheias (PINHEIRO, 2001).

Na área atual do PET, funcionou, na década de 70, o Aterro Sanitário Engenheiro Goulart. Suas condições ambientais caracterizavam-se por elevado teor de umidade e por apresentar problemas decorrentes da excessiva produção de chorume, cujo tratamento adequado era imprescindível. A proposta nº. 702.306 de 31 de outubro de 1977 da Prefeitura de São Paulo, encaminhada à Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB), previa estudos de caracterização físico - química e bacteriológica desses efluentes líquidos pelo processo de lagoas de estabilização facultativa e aeróbia. Esse processo visava à preservação do meio ambiente local a baixo custo de construção,

Figura 2 - Mapa de localização do Parque Ecológico do Tietê.



manutenção e operação, além de esteticamente poder inserir-se ao plano de urbanização (PINHEIRO, 2001).

No início contava com área distribuída entre os Municípios de Salesópolis e Barueri, onde se localizam os Centros de lazer Engenheiro Goulart (Guarulhos) e a Ilha Tamboré. Com o crescimento acelerado da cidade, a construção de avenidas marginais e a apropriação de terras em suas margens, o parque foi perdendo espaço e hoje restam 1450 hectares, nos municípios de São Paulo, Guarulhos, Barueri e Santana de Parnaíba. Administrado pelo DAEE, o parque também tem como objetivo a pesquisa e a preservação da fauna e da flora, viabilizada pelo Centro de Educação Ambiental, viveiro de mudas, olaria, e orquidário. Promovem-se ali atividades de lazer, esporte e cultura. Há espaço cultural, teatro de arena, anfiteatro, minibiblioteca, salões de ginástica e dança, pistas de Cooper e bicicross, trilhas para caminhada, quadras poliesportivas, campos de futebol, quiosques, entre outras instalações (SECRETARIA DO ESTADO DO MEIO AMBIENTE, 2000).

A área do parque é dividida em dois Centros de Lazer: Engenheiro Goulart e Ilha do Tamboré / Ilha do

Bacuri, localizados respectivamente na Zona Leste e Oeste da Capital (ECOTIETE, 2005).

O Centro de Lazer Engenheiro Goulart está localizado aproximadamente a 14 quilômetros do centro da cidade de São Paulo e situado na região da planície de inundação do rio Tietê (Áreas de Várzea), na divisa dos municípios de São Paulo e Guarulhos. Está inserido numa zona urbanizada e é atravessado pela rodovia Ayrton Senna (URBINATTI, 2000).

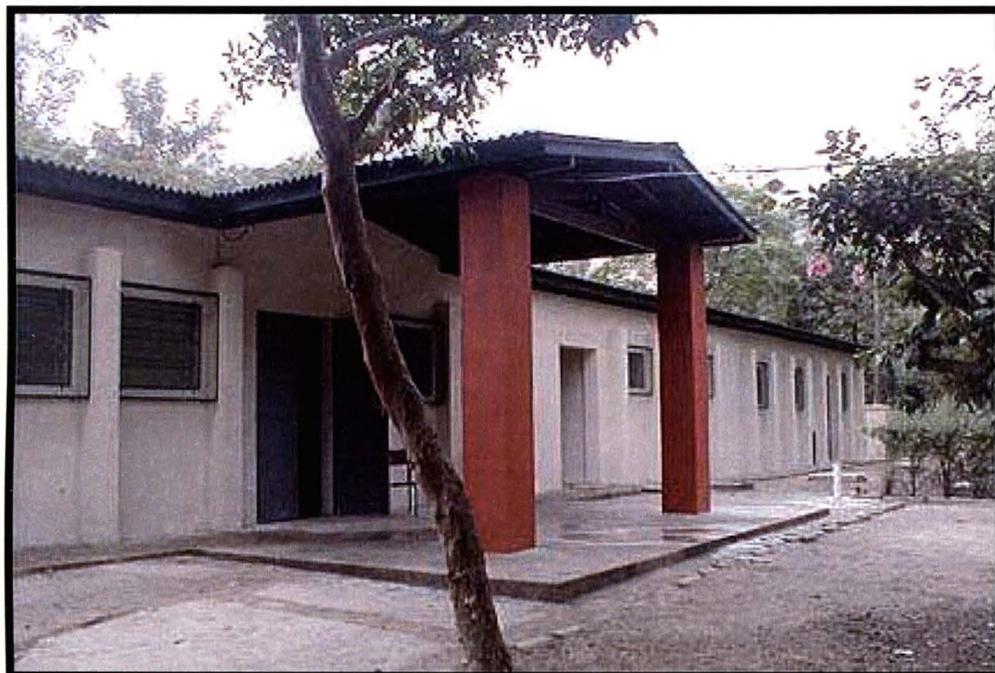
Dentro do Parque residem cerca de 15 famílias de funcionários e cerca de 9.500 (nove mil e quinhentos) invasores. O aumento no número de invasores vem sendo observado nos últimos anos e deve-se ao desequilíbrio econômico-social presente na região leste da Cidade de São Paulo. O padrão habitacional da população é caracterizado por moradias constituídas por dois ou três cômodos, onde vivem em média cinco pessoas. Não há registro sobre o exato número de casas e de moradores dessa região. O número apresentado acima se refere a informações fornecidas pelo Administrador do Parque.

O Parque possui uma área denominada Centro de Recepção de Animais Silvestres (C.R.A.S) que recebe animais

silvestres oriundos de apreensões do tráfico ilegal de animais silvestres realizados pela Polícia Federal, IBAMA e também pela doação de particulares (ECOTIETE, 2006).

A unidade Engenheiro Goulart abriga também o primeiro centro de recuperação de animais silvestres instalado no país, que recebe animais doados ou apreendidos pela Polícia Federal e pelo IBAMA. Muitos desses animais apresentam ferimentos, às vezes irreversíveis, por agressões sofridas no convívio com o ser humano ou por maltratos nas mãos de traficantes de animais. Alguns macacos, por exemplo, apresentam dentes serrados para impedir mordidas; pássaros têm olhos perfurados ou queimados por bitucas de cigarro com o objetivo de ficarem mais dóceis e cantarem; e aves de rapina têm suas garras arrancadas para não agredirem fisicamente o homem (ECOTIETÊ, 2006).

Figura 3 - Fachada do Centro de Recepção de Animais Silvestres.



Extraído de: ECOTIETE, 2006.

Em média 250 animais chegam ao parque mensalmente. São aves como araras, tucanos, papagaios, periquitos, pássaros pretos, coleirinhas e canários da terra. Os répteis mais comuns são lagartos e jabutis e mamíferos: sagüis, macaco-prego, quatis, gambás, antas e catetos. Ao chegarem ao Parque, os animais passam por uma avaliação realizada pela equipe técnica, composta por biólogos e veterinários, realizam exames clínicos e parasitológicos, recebem o tratamento necessário e alimentação adequada, e após um período de recuperação,

realizado em viveiros e áreas de procriação são destinados a programas de soltura e repovoamento. Muitos animais, no entanto, não se adaptam mais à vida em liberdade e estão condenados a viverem isolados pelo resto da vida. Dada à disponibilidade de alimento e abrigo, o PET é utilizado por aves migratórias de várias regiões e por mamíferos introduzidos no local (ECOTIETÊ, 2006).

Figura 4 - Quatis do Parque Ecológico Tiete



Extraído de: VICENTIN EC, 2006.

Figura 5 - Bugio do C.R.A.S.



Extraído de: CRIVELARO TB, 2006.

Figura 6 - Ave silvestre do C.R.A.S



Extraído de: CRIVELARO TB, 2006.

4.2 CLIMA

O vale do Tietê, onde está implantado o PET, encontra-se em uma área classificada como clima úmido subtropical de inverno seco, com temperaturas médias anuais entre 18 e 22°C e precipitação anual variando, na área do Parque, entre 1300 e 1500mm. O mês mais úmido é janeiro,

com precipitação média de 210mm e o mais seco é julho, com precipitação média de 30 mm. A região da Grande São Paulo está submetida, ao longo do ano, às influências dos sistemas tropical e polar atlântico de massas de ar, sendo o primeiro, predominante no verão e outro, durante praticamente o restante do ano (PINHEIRO, 2001).

4.3 AS MIGRAÇÕES

Todo ano, com a aproximação do outono, milhões de aves migram das regiões de reprodução situadas no hemisfério norte, em busca de locais com temperaturas mais amenas e com maior disponibilidade de alimento, para depois retornarem às suas áreas de origem durante a primavera e verão, completando assim, seu ciclo biológico. O Brasil está na rota de muitas espécies de aves migratórias, tanto de visitantes setentrionais (aves Neárticas), que possuem seus sítios de reprodução no hemisfério norte, como as meridionais (aves Neotropicais), que reproduzem em áreas do hemisfério sul.

As migrações são realizadas por muitos grupos de aves e por isso são complexas e variáveis, em decorrência da diversidade de estratégias utilizadas pelas diferentes espécies migratórias. Os habitats selecionados pelas aves migratórias ao longo de suas rotas são diversos e estão relacionados aos hábitos alimentares, disponibilidade de recursos, etc. Devido à distribuição não-contínua desses recursos, as espécies migrantes geralmente se concentram em áreas específicas. Esses locais têm importância fundamental para a conservação dessas espécies, uma vez que, ao realizarem grandes migrações, elas necessitam de áreas-chaves para trocarem as penas, se alimentarem e adquirirem as reservas energéticas necessárias para a continuação das longas viagens. Os locais de concentração de aves migratórias, além da relevância para a conservação das aves, também são importantes no contexto de vigilância epidemiológica dos países. Sabe-se que as aves migratórias são reservatórios naturais de vírus que causam enfermidades muito importantes. Este fato causa preocupação nas autoridades de saúde dos países que estão ao longo das rotas migratórias das aves, pois sugere risco de introdução de agentes infecciosos em regiões onde não estão presentes.

Desta forma, é fundamental a realização do monitoramento das áreas onde as aves se concentram, para detectar a possível entrada de vírus no país, prevenir a disseminação desses agentes e a ocorrência de epidemias (IBAMA, 2006).

4.4 PRINCIPAIS ESPÉCIES MIGRATÓRIAS OCORRENTES NO BRASIL

São conhecidas 163 espécies de aves migratórias no Brasil, das quais 97 são consideradas do Hemisfério Norte e 66 do Hemisfério Sul (IBAMA 2006).

4.4.1 Espécies provenientes do Hemisfério Norte

Dentre essas espécies, destacam-se algumas da Ordem Charadriiformes, conhecidas popularmente como maçaricos. Outro grupo que merece destaque é o das águias e

falcões (Ordem Falconiformes). Entre as espécies mais comuns, vale assinalar os maçaricos-de-papo-vermelho (*Calidris canutus*), o branco e o de sobre-acinzentado (*Calidris alba* e *Calidris fuscicollis*, respectivamente) e os trinta-réis (*Sterna hirundo*).

A maioria destas espécies têm suas áreas de reprodução no Ártico (região localizada ao norte do Canadá) e nos Estados Unidos. Com a proximidade do outono, essas aves se deslocam para a América do Sul em busca de comida e de clima favorável, realizando migrações que alcançam aproximadamente 16.000 km. Espécies como o bacurau-norte-americano (*Chordeiles minor*), o vireo (*Vireo olivaceus*) e as andorinhas (*Progne subis*, *Hirundo rustica*, *Hirundo pyrronota* e *Dendroica striata*) também cobrem distâncias entre ida e volta de até 22.000 km. Outras espécies realizam migrações mais curtas, como os passeriformes *Vireo atricapillus*, *Vermivora luciae*, *Passerina ciris* e *Parula americana*, por exemplo. Atravessando os Estados Unidos e o Brasil em grandes bandos, a caminho da Patagônia, no sul da Argentina e do Chile, entre agosto e setembro, ou na volta, entre abril e maio, encontram refúgio em algumas áreas da costa brasileira como, por exemplo, o Salgado Paraense, no

Estado do Pará, as Reentrâncias Maranhenses, no Estado do Maranhão e o Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no Estado do Rio Grande do Sul (IBAMA 2006).

4.4.2 Espécies provenientes do Hemisfério Sul

Muitas destas espécies têm suas áreas de reprodução na Antártida e extremo sul do continente sul-americano, como o albatroz-real (*Diomedea epomorpha*), o Albatroz-de-nariz-amarelo (*Thalassarche chlororhynchus*), o bobo-escuro (*Puffinus griseus*) e outras espécies de passeriformes como o colegial (*Lessonia rufa*), galhandra-de-três-rabos (*Mimus triurus*) e o príncipe (*Pyrocephalus rubinus*) (IBAMA, 2006).

4.5 LOCAIS DE COLETA NO PET

Todos os quatro pontos de coletas estão a, aproximadamente, 726 metros de altitude, e foram escolhidos de acordo com suas características ecológicas, para representar todas as áreas do PET.

Os pontos de coleta 1, 2 e 3 estão localizados dentro do centro de Lazer Engenheiro Goulart. No ponto de coleta 1 há um lago, vegetação com espécies nativas de mata atlântica, mas com o predomínio de eucaliptos. O ponto de coleta 2 apresenta vegetação secundária da Mata Atlântica. Nesse ponto se encontra também o Centro de Recepção de Animais Silvestres (CRAS). No CRAS, trabalham veterinários para receber e cuidar dos animais que chegam ao PET. Esses animais são mantidos em cativeiro.

Os pontos 1 e 2 estão localizados dentro de uma área restrita do parque, onde os visitantes não têm acesso. Já o ponto de coleta 3 está localizado em área aberta e localiza-se próximo a Administração do Parque. No ponto de coleta 4, está um canal de circunvalação, denominado Rio Negrinho. A margem esquerda do córrego abriga uma área

invadida, com aproximadamente nove mil habitantes. As habitações e as condições de saneamento são precárias, principalmente no local onde o córrego recebe o esgoto clandestino e parte de resíduos sólidos gerados por esses habitantes.

Figura 7 - Ponto de coleta 1.



Extraído de: CRIVELARO TB, 2006.

Figura 8 - Ponto de coleta 2.



Extraído de: CRIVELARO TB, 2006.

Figura 9 - Ponto de coleta 3.



Extraído de: Laporta GZ, 2005

Figura 10 - Ponto de Coleta 4.



Extraído de: CRIVELARO TB, 2006.

4.6 OBTENÇÃO, ACONDICIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS *Aedes scapularis*

As coletas entomológicas foram realizadas no período de junho de 2005 a junho de 2006, mensalmente, empregando-se aspiradores à bateria, segundo modelo descrito por NASCI (1981). Os mosquitos foram coletados

durante 20 minutos em cada ponto de coleta, mortos com acetato de etila e em seguida acondicionados em tubos de vidro tipo hemólise contendo sílica gel. As amostras de mosquitos foram mantidas à temperatura ambiente até a identificação das espécies e os indivíduos ingurgitados foram processados para a determinação do sangue ingerido.

Figura 11 - Aspirador segundo modelo descrito por NASCI.



Extraído de: CRIVELARO TB, 2005.

4.7 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA ELISA

O sangue dos mosquitos foi obtido através da trituração do mesmo seguindo a metodologia de CHOW et al. (1993) com modificações. Os mosquitos foram colocados individualmente em tubos plásticos (tipo Eppendorf) de 1,5 ml, onde foi adicionado 50 µl de PBS. Em seguida o mosquito foi triturado com pistilo, de polipropileno (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) adaptado ao triturador elétrico Foredom, The Foredom Company, Bethel, Ct.. Após a trituração foi adicionado 150 µl de PBS, totalizando volume final de 200 µl. As amostras foram homogeneizadas, transferidas para microtubos e congeladas a -20°C até serem testadas.

Como controle negativo foram utilizados machos coletados na área de estudo e/ou criados em insetário.

Para o teste foram usadas placas de microtitulação de PVC, sensibilizadas por 1 hora em temperatura ambiente com 50 µl de anti-soro diluído em PBS e mantidas em câmara úmida. Após a retirada do conteúdo da sensibilização, as placas foram bloqueadas por 1 hora com 200 µl de leite Molico Nestlé® diluído a 5%, à temperatura

ambiente, em câmara úmida. Em seguida, o leite foi retirado e foram adicionados 50 µl de amostra, acrescidos dos controles negativos, e novamente incubado por duas horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após três lavagens com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), foram adicionados as placas 50 µl do conjugado peroxidase que foi diluído em leite a 2,5%. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e a seguir, foram adicionados 100 µl da mistura cromógena ABTS. Após 30 minutos, a temperatura ambiente e em câmara escura, os valores de absorbância foram obtidos após a leitura a 405 nm, em leitor de ELISA (Reader 230 S, Organon Teknika, Microwell System).

4.8 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA ELISA INDIRETO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SANGUE INGERIDO

Para a identificação do sangue hospedeiro-específico nos *Aedes scapularis*, utilizou-se a técnica

denominada ELISA indireto, baseada na metodologia de Chow et al. (1993), com modificações para a detecção de anti-soros de homem, galinha, cão e rato.

Nos testes de padronização foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo de digestão versus limiar de reatividade no ELISA, quantidade de sangue ingerido versus positividade no teste e titulações em bloco para a definição das melhores concentrações de cada anti-soro e de cada conjugado peroxidase. A especificidade do teste foi verificada para cada animal estudado, adicionando-se antígeno homólogo e heterólogo ao anti-soro avaliado.

4.9 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO HUMANO PARA REPASTO SANGUÍNEO

Para o teste ELISA foram usadas placas de microtitulação de PVC, sensibilizadas por 1 hora em temperatura ambiente com 50 µl de anti-soro humano diluído em PBS e mantidas em câmara úmida. Após a retirada do conteúdo da sensibilização, as placas foram bloqueadas por

1 hora com 200 µl de leite Molico Nestlé® diluído a 5%, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, o leite foi retirado e foram adicionados 50 µl de sangue humano nas diluições 1/200, 1/500 e 1/750 em PBS, acrescidos dos controles negativos, e novamente incubado por duas horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após três lavagens com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), foram adicionados as placas 50 µl do conjugado peroxidase anti-humano que foi diluído em leite a 2,5%. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e a seguir, foram adicionados 100 µl da mistura cromógena ABTS. Após 30 minutos, a temperatura ambiente e em câmara escura, os valores de absorbância foram obtidos após a leitura a 405 nm, em leitor de ELISA (Reader 230 S, Organon Teknika, Microwell System). Todos os testes foram feitos em duplicata.

4.10 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO GALINHA PARA REPASTO SANGUÍNEO

Para o teste ELISA foram usadas placas de microtitulação de PVC, sensibilizadas por 1 hora em temperatura ambiente com 50 μ l de anti-soro galinha diluído em PBS e mantidas em câmara úmida. Após a retirada do conteúdo da sensibilização a placa foi bloqueada por 1 hora com 200 μ l de leite Molico Nestlé® diluído a 5%, à temperatura ambiente em câmara úmida.

Em seguida, o leite foi retirado e foram adicionados a placa 50 μ l de sangue de galinha nas diluições 1/200, 1/500 e 1/750 em PBS, acrescidos dos controles negativos, e novamente incubado por duas horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Após três lavagens com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), foi adicionado as placas 50 μ l do conjugado peroxidase anti-galinha, diluído em leite a 2,5%. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e a seguir, foram adicionados 100 µl da mistura cromógena ABTS. Após 30 minutos, a temperatura ambiente e em câmara escura, os valores de absorbância foram obtidos após a leitura a 405 nm, em leitor de ELISA (Reader 230 S, Organon Teknika, Microwell System). Todos os testes foram feitos em duplicata.

4.11 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO DE CÃO PARA REPASTO SANGUÍNEO

Para o teste ELISA foram usadas placas de microtitulação de PVC, sensibilizadas por 1 hora em temperatura ambiente com 50 µl de anti-soro de cão diluído em PBS e mantidas em câmara úmida. Após a retirada do conteúdo da sensibilização a placa foi bloqueada por 1 hora com 200 µl de leite Mólico Nestlé® diluído a 5%, à temperatura ambiente em câmara úmida.

Em seguida, o leite foi retirado e foram adicionados a placa 50 µl de sangue de cão nas diluições

1/200, 1/500 e 1/750 em PBS, acrescidos dos controles negativos, e novamente incubado por duas horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Após três lavagens com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), foi adicionado as placas 50 µl do conjugado peroxidase anti-cão, diluído em leite a 2,5%. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e a seguir, foram adicionados 100 µl da mistura cromógena ABTS. Após 30 minutos, a temperatura ambiente e em câmara escura, os valores de absorbância foram obtidos após a leitura a 405 nm, em leitor de ELISA (Reader 230 S, Organon Teknika, Microwell System). Todos os testes foram feitos em duplicata.

4.12 PADRONIZAÇÃO DO ANTI-SORO RATO PARA REPASTO SANGUÍNEO

Para o teste ELISA foram usadas placas de microtitulação de PVC, sensibilizadas por 1 hora em temperatura ambiente com 50 μ l de anti-soro de rato diluído em PBS e mantidas em câmara úmida. Após a retirada do conteúdo da sensibilização a placa foi bloqueada por 1 hora com 200 μ l de leite Molico Nestlé® diluído a 5%, à temperatura ambiente em câmara úmida.

Em seguida, o leite foi retirado e foram adicionados a placa 50 μ l de sangue de rato nas diluições 1/200, 1/500 e 1/750 em PBS, acrescidos dos controles negativos, e novamente incubado por duas horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Após três lavagens com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), foi adicionado as placas 50 μ l do conjugado peroxidase anti-rato, diluído em leite a 2,5%. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e a seguir, foram adicionados 100 μ l da mistura cromógena ABTS. Após 30 minutos, a temperatura ambiente e em câmara escura, os valores de absorbância foram obtidos após a leitura a 405 nm, em leitor de ELISA (Reader 230 S, Organon Teknika, Microwell System). Todos os testes foram feitos em duplicata.

4.13 LIMIAR DE REATIVIDADE

O limiar de reatividade (*cut off*) deve ser muito bem definido e assim, evitar resultados falsos positivos ou falsos negativos.

A determinação do *cut off* é definida pela média do nível de absorbância (densidades ópticas - DO) de amostras negativas acrescidas de três desvios padrão ($CO = X + 3 SD$, onde X = média aritmética do nível de absorbância e SD = desci padrão).

O *cut off* foi estabelecido, diariamente, para cada placa testada. O valor para cada placa foi definido

pela média das DO's de 8 amostras negativas acrescidas de três desvios padrão.

4.14 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE DIGESTÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE POSITIVIDADE DO TESTE ELISA INDIRETO

Para avaliar a capacidade do teste ELISA indireto em relação ao tempo de digestão do sangue ingerido pelos mosquitos, foi realizado experimento utilizando-se exemplares de *Aedes aegypti* criados em gaiolas no insetário do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da SUCEN a uma temperatura de 26°C a 28°C com umidade relativa de 80%. As fêmeas foram separadas individualmente em frascos de Borrel. Já separadas, após o repasto sanguíneo humano, as fêmeas foram mortas por congelamento após 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 e > 48 horas e submetidas ao teste ELISA.

4.15 VOLUME DE SANGUE E SENSIBILIDADE DO TESTE

ELISA

Para verificar a sensibilidade do teste ELISA indireto para detectar volumes diferentes de sangue nos mosquitos, foram realizados experimentos empregando volumes distintos de sangue. Justifica-se o teste pela necessidade de se detectar pequenas quantidades de sangue no organismo do inseto. Isso por que as fêmeas podem não realizar repasto sangüíneo completo e eventualmente o volume de sangue ingerido pode ser insuficiente para ser detectado pelo teste ELISA. Os ensaios foram realizados sensibilizando-se as placas com anti-soro humano na concentração ideal de uso (previamente determinada) e após bloqueio acrescentaram-se diluições seriadas de 5 μ l a 0,125 μ l. O protocolo seguido foi o descrito em 4.8 do item material e método. Os resultados foram interpretados baseando-se nas variações das densidades ópticas das placas frente aos diferentes volumes empregados.

4.16 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Foram testadas 843 fêmeas. Os resultados podem ser observados nas tabelas 1 a 6.

A fim de determinar a significância das diferenças de locais de coleta foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2). O nível de significância de qui-quadrado foi de 5% ($\alpha = 0,005$).

Para a verificação da diferença entre as frequências esperadas e observadas, foi feita a análise dos resíduos (Zres), através da fórmula:

$$\mathbf{Zres = O - E / (\sqrt{E} \sqrt{(1 - TC/TG) (1 - TL/TG)})}$$

Onde:

O = Frequência observada

E = Frequência esperada

TG = Total geral da tabela

TC = Total da coluna

TL = Total da Linha

Dentro de um nível de significância de 5%, houve excesso de ocorrências quando o resíduo foi superior a 1,96 e falta de ocorrências quando o resíduo foi inferior a - 1,96.

5. RESULTADOS

Foram testadas 843 fêmeas de *Aedes scapularis* com sangue no abdômem.

Das 843 fêmeas testadas, 336 foram positivas para os tipos de sangue analisados. Em resumo, o teste ELISA indireto detectou:

- Anticorpo IgG humano diluições de:
 - 0,625:5000 para anti-soro de captura;
 - 0,625:5000 para o conjugado de peroxidase
- Anticorpo IgG galinha diluições de:
 - 0,625:5000 para anti-soro de captura;
 - 0,625:5000 para o conjugado de peroxidase;
- Anticorpo IgG cão diluições de:
 - 0,835:5000 para anti-soro de captura;
 - 2,5:5000 para o conjugado de peroxidase;
- Anticorpo IgG rato diluições de:
 - 5:5000 para anti-soro de captura;
 - 1,8:5000 para o conjugado de peroxidase;

Tabela 1: Resultados do teste ELISA para repasto sanguíneo em fêmeas de *Aedes scapularis* coletados no Parque Ecológico do Tietê, SP.

Fonte de sangue: nº de positivos (e %)								
Pontos de coleta	Total Testados	Total Positivos	Total Negativos	Humano	Galinha	Cão	Rato	Repasto Misto
Ponto 1	121	31 (25,62)	90 (74,38)	10 (32,26)	4 (12,90)	9 (29,03)	3 (9,68)	5 (16,13)
Ponto 2	557	259 (46,50)	298 (53,50)	45 (17,37)	11 (4,25)	101 (39)	11 (4,25)	91 (35,13)
Ponto 3	157	41 (26,11)	116 (73,89)	12 (29,27)	5 (12,20)	17 (41,46)	1 (2,44)	6 (14,63)
Ponto 4	8	5 (62,50)	3 (37,50)	0	0	2 (40)	2 (40)	1 (20)
TOTAL	843	336 (39,86)	507 (60,14)	67 (19,94)	20 (5,95)	129 (38,39)	17 (5,06)	103 (30,66)

Na tabela 1, estão apresentados os resultados obtidos pelo teste ELISA indireto para as 843 fêmeas coletadas no Parque Ecológico do Tietê.

Os dados estão representados junto com o cálculo de porcentagem. A porcentagem dos mosquitos negativos e positivos está calculada em relação ao número total de mosquitos coletados, por ponto de coleta. A porcentagem dos resultados obtidos para cada hospedeiro testado está calculada em relação ao número total de positivos, também para cada ponto de coleta.

Tabela 2: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no Parque Ecológico do Tietê, SP.

Pontos de coleta	Positivos	Negativos	Total
Ponto 1	31	90	121
Ponto 2	259	298	557
Ponto 3	41	116	157
Ponto 4	5	3	8
TOTAL	336	507	843

$$\chi^2 = 34,57$$

χ^2 crítico= 7,815

gl = 3

α = 5%

P < 0,001

Na tabela 2, observamos que, de modo geral, o ponto de coleta 2, se destaca pela grande quantidade de fêmeas positivas para sangue canino (39%) e repastos múltiplos (35,13%).

Observa-se ainda que, das 843 fêmeas de *Aedes scapularis* testadas, 507 foram negativas. Essa porcentagem é relativamente alta e pode indicar repasto em outros hospedeiros não testados. Mesmo com esta alta porcentagem de negativos para os sangues testados, obteve-se um χ^2 observado de 34,57 com $p < 0,001$ para o nível de significância de 5%, 3 graus de liberdade (3gl) e χ^2 crítico de 7,81.

Tabela 3: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no ponto 1 e no ponto 2 do Parque Ecológico do Tietê, SP.

Pontos de coleta	Positivos	Negativos	Total
Ponto 1	31	90	121
Ponto 2	259	298	557
TOTAL	290	388	678

$$\chi^2 = 17,70$$

$$\chi^2 \text{ crítico} = 3,841$$

$$gl = 1$$

$$\alpha = 5\%$$

$$P < 0,001$$

Comparando-se a quantidade de positivos e negativos entre os pontos 1 e 2 de coletas, observa-se que a distribuição foi altamente significativa com $p < 0,001$, 1 grau de liberdade e qui-quadrado observado de 17,70.

Tabela 4: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no ponto 1 e no ponto 3 do Parque Ecológico do Tietê, SP.

Pontos de coleta	Positivos	Negativos	Total
Ponto 1	31	90	121
Ponto 3	41	116	157
TOTAL	72	206	278

$$\chi^2 = 0,01$$

$$\chi^2 \text{ crítico} = 3,841$$

$$gl = 1$$

$$\alpha = 5\%$$

$$P > 0,05$$

O teste do qui quadrado não detectou associação entre os pontos de coleta 1 e 3. Obteve-se um χ^2 observado de 0,01 para o nível de significância de 5%, 1 grau de liberdade (1gl) e χ^2 crítico de 3,841.

Tabela 5: Resultados positivos e negativos do teste ELISA para repasto sanguíneo em *Aedes scapularis* coletados no ponto 2 e no ponto 3 do Parque Ecológico do Tietê, SP.

Pontos de coleta	Positivos	Negativos	Total
Ponto 2	259	298	557
Ponto 3	41	116	157
TOTAL	300	414	714

$$\chi^2 = 20,89$$

$$\chi^2 \text{ crítico} = 3,841$$

$$gl = 1$$

$$\alpha = 5\%$$

$$P < 0,001$$

Tabela 6: Resultados do teste ELISA para repasto sanguíneo homem, cão e repasto misto em *Aedes scapularis* coletados no Parque Ecológico do Tietê, SP.

Pontos de coleta	Homem	Cão	Repasto Misto
Ponto 2	45	101	91
Ponto 3	12	17	6
TOTAL	57	118	97

$$\chi^2 = 7,52$$

$$\chi^2 \text{ crítico} = 5,991$$

$$gl = 2$$

$$\alpha = 5\%$$

$$P < 0,02$$

Os pontos 2 e 3 de coletas foram os pontos onde ocorreu uma maior quantidade de resultados positivos. O teste do qui-quadrado detectou uma associação positiva ($\chi^2 = 20,89$).

6. DISCUSSÃO

A Febre do Nilo Ocidental é enfermidade emergente que está avançando rapidamente por diversas regiões do mundo. Para obter melhor entendimento sobre a dinâmica da transmissão da doença, vários fatores como vetores, hospedeiros e meio ambiente precisam ser estudados. Dessa maneira, será possível realizar melhor prevenção e controle.

Devido as suas tendências à sinantropia, o *Aedes scapularis* tem sido objeto de estudo de vários trabalhos epidemiológicos e ecológicos. Em ambientes alterados pelo homem, este aedine aparece em grande abundância. Torna-se ainda espécie de grande interesse para a Saúde Pública pelo fato de possuir competência para transmitir arbovírus.

Segundo SANTOS (1996), fatores como abundância e disponibilidade de fontes alimentares, locais para criadouro e abrigo propiciam condições muito favoráveis para o estabelecimento de populações de mosquitos junto ao homem. Ambientes alterados pelo homem e que ainda possuem condições adequadas para o desenvolvimento dos mosquitos estimulam o processo de domiciliação. A alta densidade de *Ae. scapularis* pode causar incômodo para a população humana. Além disso, devido ao fato da proximidade do inseto

com o ambiente silvestre, o *Aedes scapularis* pode representar risco para a dispersão de patógenos silvestres para o ambiente humano.

A identificação do repasto sanguíneo em *Ae. scapularis*, além de ser de grande importância para a avaliação da capacidade vetora, pode colaborar para os estudos da epidemiologia da transmissão de doenças cujos agentes etiológicos são veiculados por esse mosquito.

Testes de precipitina foram usados para detectar o repasto sanguíneo em insetos por muitas décadas. A partir da década de 1980, o teste ELISA foi introduzido como alternativa, considerada mais eficiente.

A técnica imunoenzimática ELISA é de grande utilidade para a pesquisa de sangue ingerido pelos mosquitos. É um teste que possui a vantagem de ter alta sensibilidade e especificidade, além de necessitar de pequenos volumes das amostras, sendo capaz de identificar o material ingerido após várias horas de repasto sanguíneo.

A escolha pelo método direto e indireto ELISA está ligada ao objetivo da pesquisa. O método direto é mais simples de ser realizado e permite o processamento de

grande número de exemplares de uma única vez, sendo muito útil para a investigação de antropofilia. O ELISA indireto é técnica mais trabalhosa e é indicado quando é necessária informação para maior amplitude de hospedeiros silvestres.

EDRISSIAN e HAFIZI (1982) realizaram pesquisa para a identificação do hábito alimentar de espécies de *Anopheles* e os resultados mostraram que o ELISA é uma técnica sensível e específica para a identificação de sangue humano, mesmo 24 horas após o repasto. BURKOT e DeFOLIART (1982) utilizaram o teste ELISA indireto para identificar 16 fontes, inclusive animais silvestres.

No nosso trabalho, para garantir a inexistência de reações cruzadas entre os testes, padronizamos para cada anti-soro, para assim, achar concentração ótima, ou seja, aquela onde não há risco do sangue estar reagindo com mais de um anti-soro inespecificamente.

Foi realizada avaliação do tempo de digestão para verificar a capacidade de detecção de positividade do teste ELISA indireto. Dessa maneira, utilizou-se grupo de fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo. Esses indivíduos foram divididos em nove amostras. Dessa maneira, foi possível avaliar a sensibilidade do ELISA indireto para detectar a

presença de sangue nas fêmeas em períodos determinados de 0 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 24 horas, 48 horas e com um pouco mais de 48 horas após o repasto. Essas fêmeas passaram por todo o processo de trituração e diluição e foram submetidas ao teste ELISA. Os resultados mostraram que após 48 horas de alimentadas, o teste ELISA é capaz de detectar o sangue ingerido.

Estudos sobre a dinâmica populacional de vetores da Febre do Nilo Ocidental são de grande importância. Além do repasto sanguíneo, é necessário avaliar outros parâmetros ecológicos para determinar se a população é potencialmente vetora. Dessa maneira, há a necessidade de se avaliar se determinada população de mosquito tem competência e capacidade de transmitir o agente infeccioso. Entre os variáveis a serem avaliadas, uma delas refere-se a longevidade média da mosquito vetor quando infectado (MILBY e REISEN, 1989).

Segundo FORATTINI et al. (2000) estimar a sobrevivência do vetor ou a probabilidade do mesmo sobreviver por um dia, implica o conhecimento prévio da paridade e da duração do ciclo gonotrófico do mosquito. Este é definido como o intervalo entre oviposições, ou

seja, o espaço de tempo decorrido entre a procura e o encontro do hospedeiro para sugar e a realização de um novo repasto sanguíneo, implicando a digestão do sangue ingerido e a postura de ovos. Para KLOWDEN e BRIEGEL (1994) a duração do ciclo gonotrófico é de fundamental importância, pois oferece estimativa da oportunidade de contato com o agente etiológico e transmissão do parasita.

DEUS e KAKITANI (2006) desenvolveram pesquisa para avaliar a paridade de *Aedes scapularis* em condições de campo e de laboratório. Em condições de laboratório, 55% das fêmeas realizaram mais de um repasto para completar o ciclo gonotrófico. Quase 8% das fêmeas de campo dissecadas em laboratório estavam em busca de mais um repasto sanguíneo para a oviposição, o que corrobora a hipótese de discordância gonotrófica levantada por MENEZES (2002) para *Aedes scapularis*. Esta autora observou fêmeas repletas de sangue, em fases avançadas de oogênese.

A grande quantidade de repastos mistos, detectados nas amostras utilizadas no presente estudo, pode ser explicada por possível discordância gonotrófica da população de *Aedes scapularis* do PET.

É possível detectar a presença repastos múltiplos em testes de sangue ingerido, como o ELISA. RUBIO-PALIS et al. (1994) encontraram repastos múltiplos e consideraram que isso pode ser comum em mosquitos. BEIER et al. (1988) também relataram repastos mistos em um estudo realizado no Quênia com ELISA direto.

Para verificar o volume de sangue, presente no abdômem de um mosquito, que o teste ELISA é capaz de detectar, foi desenvolvido um experimento. Em tubos de ensaio contendo 150 μ l de PBS 1X e um mosquito sabidamente macho, triturado, foi feita uma diluição seriada de sangue humano. Dessa maneira, foram utilizados volumes variáveis de 5 μ l a 0,125 μ l de sangue humano, sempre em 150 μ l de PBS. Esse material foi submetido ao teste ELISA nas condições já padronizadas. Estes experimento mostraram que o teste ELISA indireto é capaz de detectar volumes extremamente pequenos como 0,125 μ l de sangue no abdômem do mosquito, comprovando a alta sensibilidade da reação.

Considerando a sensibilidade do ELISA para detectar pequenos volumes de sangue e a presença de anticorpos até 48 horas depois do repasto sanguíneo, é difícil afirmar que as fêmeas testadas fizeram realmente

repastos múltiplos, sendo que, só não seria considerado repasto múltiplo se a fêmea ovipor entre os repastos. O sangue ingerido de um primeiro repasto pode não ter sido digerido por completo, restando assim microlitros antes da fêmea fazer um novo repasto. Como o teste ELISA possui alta sensibilidade, é possível detectar esse primeiro repasto, mesmo que seja depois de 48 horas.

Todos esses resultados não descartam a possibilidade da fêmea estar se alimentando em período relativamente curto e também, devido à irritabilidade e reações dos hospedeiros que podem interromper a atividade hematofágica, antes da fêmea completar o repasto. Dessa maneira, há a necessidade de múltiplos repastos antes de se completar um ciclo gonotrófico. As evidências de repastos mistos em mosquitos potencialmente vetores de parasitas revestem-se de grande importância para os estudos epidemiológicos.

Os estudos de repasto sanguíneo dos mosquitos e de outros insetos hematófagos possui significativa importância em Saúde Pública, uma vez que, conhecidos os possíveis animais reservatórios de doenças, é provável estimar o potencial de transmissão dos vetores.

FORATTINI et al (1987) demonstraram que a positividade para sangue humano e para outras fontes em ambientes modificados pelo homem permite considerar a possível domiciliação da espécie, sendo necessária maior atenção a esse vetor.

A presença de animais domésticos no peridomicílio exerce atração sobre as fêmeas de *Aedes scapularis*.

Este estudo também reforça as evidências que indicavam o repasto sanguíneo de *Aedes scapularis* de exercer sua hematofagia em fontes alimentares no ambiente alterado pela ação humana.

Outros parâmetros entomológicos e ecológicos devem ser avaliados para a correta discriminação das possíveis espécies responsáveis pela transmissão de agentes infecciosos.

7. CONCLUSÃO

- O teste ELISA indireto foi capaz de distinguir cada uma das quatro fontes de sangue para as fêmeas de *Aedes scapularis* testadas.

- Os testes de padronização, quantidade de sangue ingerido e de tempo de digestão comprovaram que o teste ELISA indireto é realmente muito sensível e específico.

- Os resultados para sangue misto podem ocorrer devido ao ciclo gonotrófico ou, os mosquitos podem realmente fazer o repasto em várias fontes alimentares.

8. REFERÊNCIAS

Ângelo C. Vírus do Nilo aterrissa na América do Sul. Folha de São Paulo, São Paulo, 03 mai 2006.

Araújo FAA, Vianna RST, Wada MY, Silva EV, Doretto L. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para a detecção do vírus da febre do Nilo Ocidental e outros vírus. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, **Bol Eletron Epidemiol**, ano 4, N°. 2, 19/02/2004 (www.saude.gov.br/svs) (a).

Araújo FAA, Vianna RST, Andrade-Filho GV, Melhado DL, Todeschini B, Cavalcante GC, fedrizzi CE, Magalhães VS, Scherer A, Almeida MAB, Portella AS, Santos E, Scherer SB, Doretto L, Martins LC, Rodrigues SG, Vasconcelos PFC. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para a detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, **Bol Eletron Epidemiol**, ano 4, N°. 5, 21/06/2004 (www.saude.gov.br/svs) (b).

Arnell JH. A revision of the scapularis group of *Aedes* (Ochlerotatus). *Contrib. Amer. Ent. Inst. Mosquito Studies* XXXIII, 1976; 13:1-144.

Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan TP 2d, Koech DK, Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on An. (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol* 1988; 25: 9-16.

Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel GD, Dupuis AP, Ngo KA, Nicholas DC, Young DM, Shi PY, Kulasekera VL, Eidson ME, White DJ, Stone WB, Kramer L. West Nile Virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 679-85.

Blackmore CGM, Stark LM, Jeter WC, Oliveri RL, Brooks RG, Conti LA, Wiersma ST. Surveillance results from the first West Nile Virus transmission in Florida, 2001. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69 (2): 141-50.

Boreham PFL. Serological identification of arthropod bloodmeals and its application. PANS 1972; 18:205.

Buck PA, Sockett P, Barker IK, Drebot M, Lindsay R, Artsob HJ. West Nile virus: surveillance activities in Canada. **Annals of Epidemiology**. 2003; 13:582.

Burkot TR, Goodman WG, De Foliart GR. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg**. 1981; 30(6): 1336-41.

Burkot TR, DeFoliart GR. Bloodmeal sources of *Aedes triseriatus* and *Aedes vexans* in a southern Wisconsin forest endemic for La Crosse encephalitis virus. **Am J Trop Hyg**. 1982; 31(2): 376-381.

Campbell GL, Ceianu CS, Savage HM. Epidemic West Nile encephalitis in Romania: waiting for history to repeat itself. **Ann N Y Acad**. 2001; 951-101.

CDC. Epidemic/epizootic West Nile Virus in the United States: revised guidelines for surveillance, prevention and control; CDC, Atlanta, 2001.

CDC. Center Diseases Control. Emerging Infectious Diseases. [acesso em 24 out 2004]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/eid/>

CDC Center Diseases Control. Emerging Infectious Diseases. [acesso em 12 mar 2005]. Disponível em: <http://www.cdc.gov>

CDC Center Diseases Control. Emerging Infectious Diseases. [acesso em 22 nov 2006]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol12no04/05-1010.htm>

Chow E, Wirtz RA, Scott TW. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **J Am Mosq C Assoc.** 1993, 9 (2): 196-205.

Consoli RA, Lourenço-de-Oliveira R. Classificação e Principais Espécies de importância Sanitária In: **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

Deus JT, Kakitani I. Paridade de *Ochlerotatus scapularis* em condições de laboratório e campo. **Rev Saúde Públ.** 2006, 40(3):505-12.

DuPuis AP, Marra PP, Kramer LD. Sorologic evidence os West Nile Virus transmission, Jamaica, West Indies. **Emerg Infect Dis.** 2003; 9:860-3.

Ecotietê - Parque Ecologico do Tietê [homepage na internet]. [acesso em 25 out 2005]. Disponível em: <http://www.ecotiete.sites.uol.com.br/>

Ecotietê - Parque Ecologico do Tietê [homepage na internet]. [acesso em 18 nov 2006]. Disponível em: <http://www.ecotiete.sites.uol.com.br/>

Edrissian GH, Hafizi A. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of Anopheles mosquito bloodmeals. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1982; 76(1): 54-6.

Edrissian GH, Manouchehry AV, Hafizi A. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of the human blood index in anopheline mosquitoes collected in Iran. **J Am Mosq Control Assoc.** 1985; 1 (3): 349-52.

Estada Franco JG, Navarro Lopez R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da Rosa A. West Nile virus in México: evidence of widespread circulation since July 2002. **Emerg Infect Dis.** 2003; 9:860-3.

Ferreira WA, Ávila SLM. **Diagnóstico Laboratorial.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

Forattini, OP. et al. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Públ.** 1987; 21: 171-87.

Forattini OP, Kakitani I, Sallum MAM. Encontro de criadouros de *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) em recipientes artificiais. **Rev Saúde Públ.** 1997; 31 (5): 519-22.

FORATTINI, Oswaldo Paulo ; KAKITANI, I. ; SANTOS, R. L. C. DOS ; KOBAYASHI, K. M. ; UENO, H. M. ; FERNANDES, Z. . Potencial sinantrópico de mosquitos *Kerteszia* e *Culex* (Diptera: Culicidae) no sudeste do Brasil. **Rev Saúde Públ.** 2000; 34(6): 565-569.

Handler J, Nelson R, McCarthy T, Andreadis T, Lis MS, French R, Beckwith W, Mayo D, Archambault G, Cartter M. West Nile Virus surveillance in Connecticut in 2000: An intense epizootic without high risk for severe human diseases. **Emerg Infect Dis.** 2001; 7(4): 636-42.

IBAMA - Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação das Aves Silvestres [homepage na internet]. Aves Migratórias. [acesso em 12 jul 2006]. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/cemave/index.php?id_menu=340

Informaciones Sanitarias.[homepage na internet]. Fiebre del Nilo Occidental en Argentina. [acesso em 23 ago 2006].

Disponível

em:

http://www.oie.int/esp/info/hebdo/EIS_21.HTM#Sec3

Klowden MJ, Briegel H. Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** 1994; 31(4):618-22.

Komar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marienee NL, Burkhalter KL. West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. **Emerg Infect Dis.** 2003; 9:1299-302.

Kutz FW, Wade TG, Pagac BB. A geospatial study of the potential of two exotic species of mosquitoes to impact the epidemiology of West Nile virus in Maryland. **J Am Mosq Control Assoc.** 2003; 19(3): 190-8.

Lourenço-de-Oliveira R; R. Heyden. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calábria), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. IV. Preferências alimentares quanto ao hospedeiro e frequência domiciliar. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1986; 81(1): 15-27.

Menezes RMT. Aspectos bioecológicos de *Culex quinquefasciatus* e *Ochlerotatus scapularis*, abrigados em habitats do Parque Ecológico do Tietê na Cidade de São Paulo, SP [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2002.

Milby MM, Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: vector survivorship. **Bull Soc Vector Ecol** 1989;14:47-54.

Nasci RS. A light weight battery-powered aspirator for collecting mosquitoes in the field. **Mosquitoes News**, 1981. 41:808-811.

Nasci RS, With DJ, Stirling H, Oliver J, Daniels TJ, Falco RC, Campbell S, Crans WJ, Savage HM, Lanciotti RS, Moore CG, Godsay MS, Gottfried KL, Mitchell CJ. West Nile Virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999.

Emerg Infect Dis, 2001. 7(4): 626-30.

Natal D, Ueno HM. Vírus do Nilo Ocidental: Características da transmissão e implicações vetorais. **Entomol. Vect.**, 2004. 11(3):417-433.

Natal D, Araújo FAA, Vianna RST, Pereira LE, Ueno HM. O mosquito das águas poluídas. **Saneas**, 2004. 26-31.

Petersen LR, Martin AA, Gubler DJ. West Nile. **Jama**, 2003; 290(4):525-28.

Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TLM, Souza RP, Chamelet ELB. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). **Rev. Saude Publica**, 2001. 35(2):119-123.

Pinheiro, Cyntia Helena Ravena. Análise de diferentes fatores na disposição de metais pesados em sedimentos lacustres no PET. São Paulo, 2001 [Dissertação de Mestrado - Instituto de Geociências, universidade de São Paulo].

Reisen W, Lothrop H, Chiles R, Madon M, Cossen C, Woods L, Husted S, Kramer V, Edman J. West Nile virus in California. **Emerg Infect Dis.** 2004;10:1369-78.

Romano-Lieber NS, Iversson LB. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Rev. Saúde Pública,** 2000. 34(3):236-42.

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

Santos RLC. Observações sobre a sinantropia de *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1996.

Sardelis MR, Turell MJ, O'Guinn ML, Andre RG, Roberts DR. Vector competence of three North American strains of *Aedes albopictus* for West Nile virus. **J Am Mosq Control Assoc.** 2002; 18:284-9.

Secretaria do Estado do Meio Ambiente. Atlas das unidades de conservação do Estado de São Paulo - São Paulo, 2000.

Silva AM, Menezes RMT. Encontro de *Aedes scapularis* (Diptera:Culicidae) em criadouro artificial em localidade da região Sul do Brasil. **Rev Saude Publica.** 1996; 30:103-4.

Tamayo RR. [homepage na internet]. Virus del Nilo Occidental: aspectos epidemiológicos y clínicos. [acesso em 29 junho 2004]. Disponível em http://www.bvs.sld.cu/vats/rtv_files/rtv1000.htm.

Tempelis CH, Galindo P. Feeding habits of five species of Deinocerites mosquitoes collected in Panama. **J Med Entomol.** 1970; 7: 175-9.

Tempelis CH. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. **J Med Entomol.** 1975; 11(6): 635-53.

Tesh RB, Arroyo J, Travassos-da-Rosa APA, Guzman H, Xiao SY, Monath TP. Efficacy of killed virus vaccine, live attenuated chimeric virus vaccine, and passive immunization for prevention of West Nile virus encephalitis in hamster model. **Emerg Infect Dis.** 2002; 8(12):1392-1397.

Urbiniatti, Paulo Roberto. Imaturos de Mosquitos (Diptera:Culicidae): Caracterização de criadouros - Parque Ecológico do Tietê, Guarulhos, SP. São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

Washino RK, Else JG. Identification of blood meals of hematophagous arthropods by the hemoglobin crystallization method. **Am J Trop Med Hyg.** 1972; 21:120-122.

Washino RK, Tempelis CH. Mosquito host bloodmeal identification: methodology and data analysis. **Annu Rev Entomol.** 1983; 28: 179-201.

Weitz B. Identification of bloodmeals of blood sucking arthropods. **Bull. WHO** 1956; 15: 473-90. 1956

Weitz B. Feeding habits of bloodsucking arthropods. **Experimental Parasitology** 1960; 9: 63-82.

Zenaïd AK, Novaretti MCZ, Chamone DAF. Vírus do Nilo Ocidental - Nova ameaça à segurança transfusional? **Rev Brás Hematol Hemoter** 2004; 26(2): 114-121.