

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Padronização de técnicas moleculares para o estudo da interação
Culex sp. e *Plasmodium* spp. e aspectos ecológicos de culicídeos,
capturados no município de Seropédica, Rio de Janeiro.**

Thamyris Sampaio Vilela

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA
INTERAÇÃO *CULEX* SP. E *PLASMODIUM* SPP. E ASPECTOS ECOLÓGICOS DE
CULICÍDEOS, CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, RIO DE
JANEIRO.**

THAMYRIS SAMPAIO VILELA

Sob a Orientação do Professor

Huarrisson Azevedo Santos

E Coorientação do Professor

Carlos Luiz Massard

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V695p Vilela, Thamyris Sampaio, 1988-
Padronização de técnicas moleculares para o estudo da interação *Culex* sp. e *Plasmodium* spp. e aspectos ecológicos de culicídeos, capturados no município de Seropédica, Rio de Janeiro. / Thamyris Sampaio Vilela. - Seropédica, 2019.
91 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Carlos Luiz Massard.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2019.

1. Ecologia de vetores. 2. Malária aviária. 3. Biologia Molecular. 4. Fontes alimentares. 5. Sanidade avícola. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980, orient. II. Massard, Carlos Luiz, 1947-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

THAMYRIS SAMPAIO VILELA

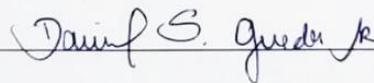
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/06/2019



Huarrisson Azevedo Santos, DSc, UFRRJ-RJ

(Orientador)



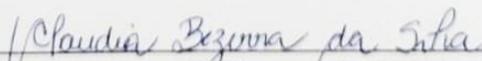
Daniel da Silva Guedes Junior, DSc, FIOCRUZ-RJ



Aline Moreira de Souza, Dsc, UFF-RJ



Maristela Peckle Peixoto, Dsc, UFRRJ-RJ



Claudia Bezerra da Silva, Dsc, UFRRJ-RJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que possibilitou que esse momento se concretizasse, com muito trabalho, esforço, dedicação e fé. Aos meus pais, Edir e Nilda que sempre me apoiaram em todas as decisões tomadas por mim, me dando a base, o conforto, o carinho e a força que me mantém. Ao meu namorado, Otávio Augusto Vieira pela paciência e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Huarrisson Azevedo Santos, e coorientador, Carlos Luiz Massard, por todo conhecimento, paciência e disponibilidade em acompanhar o desenvolvimento do meu trabalho. Ao técnico Luiz Carlos Ribeiro da Paz do Laboratório de Doenças Parasitas da UFRRJ, pela disponibilização do laboratório para triagem dos dípteros e momentos de descontração, e ao Paulo, da Secretaria de Saúde de Seropédica, por toda paciência e conteúdo técnico ensinado com qualidade.

Ao secretário do Departamento de Saúde Pública do Instituto de Veterinária, Erick Mesquita dos Santos, por toda calma e todos os cafés os quais foram meus combustíveis durante essa etapa. Aos professores Argemiro Saraiva e Isabele da Costa Angelo, pela disponibilização das armadilhas de CDC luminosas, sem as quais não seria possível realizar a captura dos dípteros e por todo suporte nos meses de coleta.

Aos técnicos de laboratório Josemar César Gonçalves por toda paciência, incentivo, dedicação, pontualidade, compromisso e apoio muitas vezes psicológicos durante todo período de coleta e na execução do estudo no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) da UFRRJ.

À colega de trabalho e amiga Nathalia Senne que também foi de suma importância para a execução deste trabalho, não só no auxílio das triagens e análises, mas também para que os dias fossem mais leves com os momentos de descontração.

Aos meus companheiros e amigos do laboratório de Sanidade Avícola da UFRRJ que conheci e levarei para toda a vida: Patrícia Gonzaga Paulino, Tays Araújo, Miguel Motta, Débora Martins, Léo Paulis e as residentes So Yin Nak e Gabriela Almeida. Vocês foram indispensáveis para a finalização deste projeto, cada um foi responsável pelo trabalho em equipe aqui executado. Com vocês aprendi a fazer ciência, ou tentar fazer, com amor, perseverança e muita risada, mas aprendemos juntos todos os dias o significado da empatia e cooperação, nos tornando uma grande família de muitos irmãos. Sem vocês o trabalho teria sido árduo e incompleto. Meu muito obrigada!

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

VILELA, Thamyris Sampaio. **Padronização de técnicas moleculares para o estudo da interação *Culex* sp. e *Plasmodium* spp. e aspectos ecológicos de culicídeos, capturados no município de Seropédica, Rio de Janeiro.** 2019. 91p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

RESUMO

A malária aviária é uma doença parasitária que apresenta ampla distribuição geográfica. No Brasil, *Plasmodium juxtenucleare* é a principal espécie causadora dessa patologia em aves da espécie *Gallus gallus*, em infecções naturais. As aves acometidas apresentam diversos sintomas que variam desde perda de peso até sinais neurológicos, ocasionando prejuízos consideráveis na indústria avícola quando o plantel é acometido. Apesar da interação hospedeiro-parasito apresentar diversos estudos, pouco se sabe sobre a interação parasito-vetor na dinâmica dessa doença, existindo apenas algumas pesquisas experimentais que demonstram a capacidade de vetoração de *Plasmodium juxtenucleare* por algumas espécies do gênero *Culex*. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies de *Culex* naturalmente infectados por *Plasmodium*, determinando o potencial de vetoração de algumas espécies, assim como identificar a fonte alimentar destes dípteros pela técnica de PCR multiplex em tempo real, possibilitando uma melhor elucidação sobre a dinâmica parasito-vetor. As espécies de Culicinae, capturadas neste estudo, foram *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes albifasciatus*, *Anopheles aquasalis*, sendo o gênero *Culex* o predominante no local de estudo. A ocorrência da infecção de dípteros por *Plasmodium* spp. apresentou uma correlação com o hábito alimentar desses insetos em aves, principalmente nos meses de maio, novembro e dezembro, que foram meses considerados quentes, úmidos e chuvosos, propiciando o aumento de *Culex* sp. na região, reforçando a influência das condições climáticas na ocorrência do vetor e conseqüentemente sua capacidade de vetoração. A padronização de duas técnicas de PCR multiplex em tempo real, de alta sensibilidade, foi realizada e cada uma delas detectou até três fontes alimentares ao mesmo tempo. Assim, pelas análises de preferência alimentar dos dípteros do gênero *Culex*, foi possível correlacionar a positividade de infecção para *Plasmodium* sp. com suas principais fontes de repasto. Dessa forma, foi possível observar uma maior predileção de mosquitos do gênero *Culex* para fontes de repasto em aves, mesmo com a presença de outras espécies animais disponíveis, evidenciando um caráter ornitófilo.

Palavra-chave: Dípteros, fonte alimentar, malária aviária, PCR Multiplex.

VILELA, Thamyris Sampaio. **Standardization of molecular techniques for studying the interaction between *Culex* sp. and *Plasmodium* spp., and ecological aspects of culicids, captured in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro.** 2019. 91 p. Thesis (Doctor of Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

ABSTRACT

Avian malaria is a parasitic disease with a wide geographical distribution. In Brazil, *Plasmodium juxtannucleare* is the main species causing this pathology in *Gallus gallus* birds in natural infections. Affected birds exhibit various symptoms ranging from weight loss to neurological signs, leading to significant losses in the poultry industry when the flock is affected. Despite numerous studies on host-parasite interactions, little is known about the parasite-vector interaction in the dynamics of this disease, with only a few experimental studies demonstrating the vectoring capability of *Plasmodium juxtannucleare* by some species of the *Culex* genus. The objective of this study was to identify *Culex* species naturally infected with *Plasmodium*, determining the vector potential of some species, as well as identifying the feeding sources of these mosquitoes using real-time multiplex PCR, enabling a better understanding of the parasite-vector dynamics. The Culicinae species captured in this study were *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes albifasciatus*, and *Anopheles aquasalis*, with the *Culex* genus being predominant in the study area. The occurrence of dipteran infection with *Plasmodium* spp. showed a correlation with the feeding habits of these insects on birds, especially in the months of May, November, and December, which were considered hot, humid, and rainy months, promoting an increase in *Culex* sp. in the region, reinforcing the influence of climatic conditions on the occurrence of the vector and consequently its vectoring capacity. The standardization of two highly sensitive real-time multiplex PCR techniques was performed, each of which detected up to three feeding sources at the same time. Thus, by analyzing the feeding preferences of *Culex* dipterans, it was possible to correlate the positivity of infection with *Plasmodium* sp. with their main feeding sources. Accordingly, a greater preference for birds as feeding sources was observed in mosquitoes of the *Culex* genus, even in the presence of other available animal species, highlighting an ornithophilic character.

Keywords: Dipterans, feeding sources, avian malaria, Multiplex PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico do parasito <i>Plasmodium</i> spp., no hospedeiro vertebrado e invertebrado. I e II representa a merogonia exo-eritrócítica primária, III ciclo eritrócítico e IV merogonia exo-eritrócítica secundária.....	8
Figura 2.	Armadilha do tipo CDC luminosa próxima à gaiola com aves.....	16
Figura 3.	Presença de hospedeiros de <i>Culex</i> sp. em ponto de coleta em área urbana, no Bairro Campo Limpo, em Seropédica, Rio de Janeiro.....	20
Figura 4.	Temperatura média (°C) referente ao mês avaliado e número de culicídeos capturados durante o estudo realizado em Seropédica, RJ, entre os anos de 2016 e 2017.....	23
Figura 5.	Umidade do ar média calculada para o mês e número de culicídeos capturados durante o estudo realizado em Seropédica, RJ, entre os anos de 2016 e 2017....	23
Figura 6.	Pluviosidade média e número de culicídeos capturados durante o estudo realizado em Seropédica, RJ, entre os anos de 2016 e 2017.....	24
Figura 7.	Produtos de PCR convencional do gene CoI das amostras de DNA de mosquito extraídas pelo método “Salting Out” (AYRES <i>et al.</i> , 2002).....	26
Figura 8.	Produtos de PCR convencional do gene CoI das amostras de DNA de mosquito extraídas pelo método Fenol- clorofórmio e Kit Qiagen, respectivamente.....	26
Figura 9.	Gradiente de temperatura oligoiniciadores Triplex 1, em que H (humano), G (galináceos) e C (canídeos). 1 (55°C) 2 (56°C) 3 (57°C) 4 (58°C) 5 (59°C) 6 (60°C) em gel de agarose a 2,5 % corado com Brometo de etídio.....	40
Figura 10.	Gradiente de temperatura oligoiniciadores Triplex 2, em que B (bovino), G (galináceos) e C (canídeos). 1 (55°C) 2(56°C) 3(57°C) 4(58°C) 5 (59°C) 6 (60°C) em Gel de agarose a 2,5 % corado com Brometo de etídio.....	40
Figura 11.	Curvas de dissociação demonstrando a tripla amplificação e diferentes temperaturas no triplex 1, utilizando os controles padrão de cada espécie com a concentração de oligoiniciadores padronizada.....	41
Figura 12.	Curvas de dissociação demonstrando a tripla amplificação e diferentes temperaturas no triplex 2, utilizando os controles padrão de cada espécie com a concentração de oligoiniciadores padronizada.....	42
Figura 13.	Curva padrão para o triplex 2 com alvo na espécie <i>Felis catus</i>	42
Figura 14.	Curva padrão para o triplex 2 com alvo na espécie <i>Bos Taurus</i>	43

Figura 15.	Curva padrão para o triplex 2 com alvo na espécie <i>Equus caballus</i>	43
Figura 16.	Curva padrão para o triplex 1 com alvo na espécie <i>Homo sapiens</i>	44
Figura 17.	Curva padrão para o triplex 1 com alvo na espécie <i>Canis familiares</i>	44
Figura 18.	Curva padrão para o triplex 1 com alvo na espécie <i>Gallus gallus</i>	45
Figura 19.	Taxa de Co-alimentação do triplex 1.....	46
Figura 20.	Taxa de Co-alimentação do triplex 2.....	46
Figura 21.	Frequência de positividade das fêmeas de <i>Culex</i> sp. com relação à espécie animal de fonte alimentar acordo com a zona ambiental de captura.....	47
Figura 22.	Taxa de alimentação de fêmeas de <i>Culex</i> sp. de acordo com espécie de hospedeiros.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locais de coleta identificados pelo bairro, a concentração populacional de humanos, a presença de vegetação densa e a classificação de zona em rural ou urbana.....	15
Tabela 2. Frequência dos gêneros identificados entre os espécimes de dípteros coletados em áreas peridomiciliares com presença de aves.....	20
Tabela 3. Índices ecológicos de dípteros capturados por armadilha luminosa CDC no período entre agosto de 2016 a julho de 2017, em áreas peridomiciliares no município de Seropédica, Rio de Janeiro.....	21
Tabela 4. Oligoiniciadores das espécies contidas no multiplex.....	35
Tabela 5. Melhores temperaturas de anelamento dos oligoiniciadores.....	41
Tabela 6. Tabela de contingência de fêmeas de <i>Culex</i> sp. alimentadas capturadas em duas áreas distintas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de gatos.....	47
Tabela 7. Tabela de contingência de fêmeas de <i>Culex</i> sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de equino.....	48
Tabela 8. Tabela de contingência de fêmeas de <i>Culex</i> sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de bovino.....	48
Tabela 9. Tabela de contingência de fêmeas de <i>Culex</i> sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de cão.....	48
Tabela 10. Tabela de contingência de fêmeas de <i>Culex</i> sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de humano.....	49
Tabela 11. Tabela de contingência de fêmeas de <i>Culex</i> sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de galinha.....	49
Tabela 12. Correlação das espécies testadas no estudo como fonte de repasto e os valores encontrados no índice de Shannon.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CoI	Subunidade I do citocromo oxidase
Cq	Ciclo de quantificação
Cx	<i>Culex</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
HRM	<i>Hight Resolution Melting</i>
Pb	Pares de bases
nPCR	<i>Nested polymerase chain reaction</i> (Reação da cadeia polimerase nested)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação da cadeia polimerase)
qPCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i> (Reação da cadeia polimerase em tempo real)
NaCl	Cloreto de Sódio
Tm	Temperatura de dissociação
Tris-HCl	<i>Tris Hydrochloride</i> (Tris ácido clorídrico)
ΔRn	Reporter normalizado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Bioecologia de culicídeos	3
2.2. A biologia de transmissão de patógenos por culicídeos: um enfoque em <i>Plasmodium spp.</i>	4
2.3. Vetores de <i>Plasmodium juxtenucleare</i>	5
2.4. Identificação de mosquitos da subfamília Culicinae	5
2.5. <i>Plasmodium spp.</i>: agente etiológico	6
2.6. Métodos diagnósticos de <i>Plasmodium spp.</i> em aves	8
CAPÍTULO I	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Área de Estudo	15
2.2. Coleta de Amostras	15
2.3. Tamanho da amostra	16
2.4. Coleta de Dados Climáticos	17
2.5. Índices Ecológicos	17
2.6. Teste dos protocolos de extração de DNA genômico dos mosquitos	17
2.7. Verificação da qualidade do DNA genômico	18
2.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose	18
2.9. Ensaio de PCR em tempo real para detecção de <i>Plasmodium spp.</i>	18
2.10. Ensaio de PCR convencional para sequenciamento e diferenciação de espécies de <i>Culex sp.</i> positivas para <i>Plasmodium spp.</i>	19
2.11. Análise Estatística	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1. Dípteros coletados e caracterização da área de estudo	20
3.2. Resultados dos índices ecológicos	21

3.3. Avaliação dos protocolos testados para extração de DNA genômico dos mosquitos..	24
3.4. Execução do Protocolo de Eleição	25
3.5. Resultado da qualidade do DNA genômico	25
3.6. Resultados do ensaio de PCR em tempo real para detecção de <i>Plasmodium</i> spp.....	26
4. CONCLUSÕES.....	28
CAPITULO II	29
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Obtenção das amostras controles de fonte alimentar	35
2.2. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para detecção da fonte alimentar	35
2.3. Limite de detecção de DNA dos controles de fonte alimentar	36
2.4. Gradiente de temperatura de anelamento dos oligoiniciadores	36
2.5. Padronização dos ensaios de PCR em tempo real seguido de análise de alta resolução (HRM).....	36
2.6. Otimização da concentração de oligoiniciadores iniciadores para cada fonte alimentar	37
2.7. Validação dos ensaios triplex qPCR com <i>High Resolution Melt</i>	37
2.8. Análise Estatística	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Teste de gradiente de temperatura de anelamento dos oligoiniciadores	39
3.2. Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores para cada fonte alimentar.....	41
3.3. Limite de detecção da qPCR HRM para cada alvo testado.....	42
3.4. Validação de dois ensaios de PCR em tempo real utilizando <i>High Resolution Melt</i> ...	45
4. CONCLUSÕES.....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	534

6. ANEXOS	549
------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO GERAL

A malária aviária é uma patologia amplamente distribuída que afeta aves de diversas espécies em todo o mundo. A sintomatologia apresenta falta de apetite, anemia, distúrbios digestivos, neurológicos e sonolência. As aves infectadas também podem apresentar queda na produtividade de ovos quando comparadas a aves não infectadas. Seu principal agente etiológico é um protozoário do gênero *Plasmodium*.

Os parasitos deste gênero podem ser encontrados em todos os continentes. Na ordem dos Galliformes, que inclui principalmente as galinhas domésticas, perus, perdizes e faisões, as principais espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* que as acometem são o *Plasmodium gallinaceum* e o *Plasmodium juxtannucleare*. O primeiro ocorre principalmente na Europa apresentando como principais vetores dípteros dos gêneros *Anopheles* e *Culex*. O segundo ocorre na África, Ásia e América Latina possuindo como vetor algumas espécies do gênero *Culex*.

Embora existam estudos frequentes sobre a interação entre espécies do gênero *Plasmodium* e aves, o papel dos vetores na transmissão do parasito ainda é pouco conhecida e estudada. Esta questão está relacionada ao surgimento recente de técnicas moleculares mais sensíveis, que hoje são capazes de fornecer mais acesso ao material genético, possibilitando a detecção e a identificação de linhagens de *Plasmodium* spp. que infectam uma determinada espécie de vetor. Também é possível a identificação dos vetores, que são mosquitos do gênero *Culex*, pois, em muitos momentos, a identificação morfológica apresenta grande dificuldade devido aos complexos relacionados aos gêneros e espécies geneticamente semelhantes.

A interação entre hemoparasitos aviários e seus vetores, pode ser afetada por fatores genéticos e ambientais, que podem causar variação espacial e temporal na prevalência do parasito de acordo com a sua. Entretanto, devido à estas dificuldades de diagnóstico, fica difícil determinar sua diversidade em grandes escalas geográficas. O acesso ao conhecimento dos padrões biogeográficos pode auxiliar na compreensão da evolução e ecologia das interações parasito-hospedeiro e como estes padrões podem influenciar na diversidade dos parasitos. Alguns estudos sugerem ainda que *Plasmodium* spp. pode alterar as preferências de alimentação e comportamento alimentar de mosquitos infectados.

O presente estudo teve como objetivos analisar a capacidade vetorial de mosquitos do gênero *Culex*, em transmitir espécies do gênero *Plasmodium* spp. em aves da espécie *Gallus gallus*, analisando os principais fatores ecológicos relacionados ao vetor, análise da taxa de

infecção por qPCR e desenvolvimento de um ensaio biomolecular, com base na técnica de Multiplex PCR HRM (*High Resolution Melting*), capaz de identificar as principais fontes de alimentação para mosquitos.

O protocolo desenvolvido neste estudo teve como finalidade estabelecer a capacidade de infecção de mosquitos por parasitos do gênero *Plasmodium*, além de elucidar o papel desses vetores na condução de patógenos entre os hospedeiros aviários, contribuindo para futuros estudos sobre o papel ecológico das espécies de hospedeiros vertebrados no apoio ao crescimento da população de mosquitos e nos ciclos de transmissão de patógenos, considerando sua susceptibilidade e/ou disponibilidade em relação as possíveis fontes de repasto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bioecologia de culicídeos

Os culicídeos são insetos de pequeno porte e corpo delgado, que são chamados popularmente de mosquitos, carapanãs e pernilongos. Os ovos apresentam uma forma elíptica ou oval e, no momento de sua oviposição, apresentam coloração clara que em contato com oxigênio torna-se escurecida (FORATTINI, 2002). Em geral, os ovos são postos diretamente na superfície da água e eclodem assim que completam o seu desenvolvimento embrionário. Entretanto, quando são deixados fora da água, os ovos podem apresentar diapausa facultativa (CAUSEY *et al.*, 1943) caracterizada por uma suspensão temporária da eclosão após o término do desenvolvimento embrionário, podendo sobreviver por períodos variáveis. Este processo ocorre naturalmente em mosquitos que depositam seus ovos fora da água, como é o caso de algumas espécies dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Psorophora*.

Após um período de maturação inicial em ambiente úmido, a resistência em ambiente seco pode se tornar muito prolongada. Vários fatores extrínsecos, como fotoperiodicidade, temperatura e nutrição, durante a fase larvária da fêmea que ovipõe, têm sido relacionados à incidência da diapausa. Para interromper a diapausa, vários estímulos podem ser necessários. O principal parece ser o contato com a água, porém, outros estímulos, como variações de temperatura e presença de microorganismos têm sido igualmente descritos (PUMPINI *et al.*, 1992).

As larvas têm um parêlo bucal do tipo mastigador, e escovas orais que auxiliam na obtenção de partículas de alimentos. Sua respiração ocorre pelo sifão respiratório (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após o estágio larvar, as larvas de 4º estágio dão origem às pupas, que apresentam o corpo dividido em duas porções: o cefalotórax e o abdômen. A respiração é realizada pelas trombas respiratórias, localizadas acima do cefalotórax, posicionadas geralmente na superfície da água. Nesta fase, não se alimentam e encontram-se em grande atividade de divisão celular para formar o corpo do animal adulto que está prestes a eclodir (FORATTINI, 2002).

O inseto adulto tem o corpo coberto por escamas e sensilas, que são órgãos sensoriais com capacidade de detectar estímulos térmicos, químicos, mecânicos e sonoros, bem como mudanças na umidade relativa do ar e na luminosidade (MEIJERINK, VAN LOON, 1999). Os adultos apresentam dimorfismo sexual: os machos têm antenas plumosas e uma peça bem visível, denominada de clasper; as fêmeas têm uma antena pilosa e um gonotremo com a abertura distal da vagina (FORATTINI, 2002; LAPORTA, 2007).

As fêmeas de diferentes espécies ovipõe em criadouros existentes no solo ou em copas das árvores. Os ovos podem ser postos em jangadas, diretamente sobre a superfície da água. Esse comportamento de oviposição varia de acordo com o gênero do mosquito (FORATTINI, 2002). As fêmeas normalmente já fecundadas pousam sobre o hospedeiro vertebrado e selecionam o local do repasto sanguíneo com seus órgãos sensoriais e, com o aparelho bucal do tipo picador-sugador, se alimentam do sangue desse hospedeiro. Pode ocorrer no momento do repasto sanguíneo uma possível infecção, já que a saliva do mosquito é inoculada no hospedeiro e esta pode conter microrganismos patogênicos como arboviroses, verminoses e hematozoários (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

2.2. A biologia de transmissão de patógenos por culicídeos: um enfoque em *Plasmodium* spp.

Caso o sangue ingerido pela fêmea, no momento do repasto sanguíneo contiver ao menos um macrogametócito, contendo um macrogameta, e um microgametócito, após exflagelação, os microgametas irão fecundar o gameta fêmea formando um zigoto. Ao maturar para oocineto, atravessa a parede do estômago formando um oocisto na subserosa. Após multiplicação assexuada formam-se os esporozoítos (forma infectante), que irão se locomover para as glândulas salivares do vetor para continuar o curso da infecção em outro hospedeiro, mantendo seu ciclo biológico. Em geral, a oviposição ocorre logo após o repasto sanguíneo, podendo ocorrer um retardo neste processo, devido a necessidade de outra alimentação, favorecendo a transmissão de patógenos. Embora a maior parte das espécies do gênero *Culex* realizarem seu repasto basicamente em aves, algumas apresentam comportamento antropofílico, tornando-se potenciais vetores de doenças para o homem (DEMARI-SILVA, 2009).

A transmissão dos patógenos por vetores pode ser afetada pela dinâmica das populações de mosquitos, pela densidade de hospedeiros suscetíveis (LAPOINTE *et al.*, 2005) e pelos fatores ambientais (LAPOINTE *et al.*, 2012). Essas variáveis afetam tanto o comportamento do vetor (LA PUENTE *et al.*, 2009) quanto o desenvolvimento do parasito. A temperatura e precipitação são variáveis bióticas importantes, que podem ser determinantes no desenvolvimento e reprodução do vetor. Estes dados ratificam os estudos primordiais, apontando que a presença dos hemoparasitos está relacionada à dinâmica das estações, com maior prevalência e parasitemia nas aves em meses do ano em que as temperaturas são mais elevadas (DANILEWSKY, 1886).

Há evidências que apontam para uma tendência de especialização dos mosquitos do gênero *Culex* em relação às diferentes linhagens de *Plasmodium*. Isso sugere que esses mosquitos podem atuar como barreiras ecológicas, limitando a propagação de linhagens de aves hospedeiras que fazem parte da dieta desses vetores (HELLGREN *et al.*, 2007). Esse fenômeno sugere que as variações na ocorrência do parasito em diferentes habitats podem estar diretamente ligadas à presença ou ausência de vetores apropriados (YOHANNES *et al.*, 2009).

2.3. Vetores de *Plasmodium juxtannucleare*

Experimentalmente, algumas espécies do gênero *Culex* foram incriminadas como potenciais vetores de *Plasmodium juxtannucleare*. Paraense *et al.* (1944) demonstrou a ocorrência de esporozoítos de *Plasmodium* spp. em dois exemplares de *Culex quinquefasciatus*. Bennet *et al.* (1966), conseguiram infectar as espécies *Culex gelidus*, *Culex tritaeniorrhynchus* e *Culex pseudovishnui* com *P. juxtannucleare* em altos índices de positividade e, na Malásia, descreveram estágios esporogônicos de *P. juxtannucleare* em *Culex sitiens* e *Culex annulus* naturalmente infectados. No Sri Lanka, Niles e Kulasiri (1967) isolaram *P. juxtannucleare* de *Mansonia crassipes*, capturados na natureza. Krettli (1972) estudou a infecção experimental em *C. quinquefasciatus*, demonstrando o oocisto pedunculado na subserosa do estômago do mosquito.

No Brasil, Lourenço de Oliveira e Castro (1991) estudando os possíveis vetores de *P. juxtannucleare*, capturaram mosquitos no Rio de Janeiro e as seguintes espécies estavam infectadas, com a utilização de um indivíduo capturador: *Culex saltanensis*, *Culex declarator*, *Culex coronator*, *Culex quinquefasciatus* e *Culex bidens*. Segundo estes autores *Culex saltanensis* foi o mais frequente em criações de galinhas.

2.4. Identificação de mosquitos da subfamília Culicinae

Os culicídeos estão incluídos taxonomicamente na Ordem Díptera, Família Culicidae e Subfamília Culicinae, sendo *Culex* o gênero foco do presente estudo. Além deste gênero, a subfamília Culicinae compreende 11 tribos, 92 gêneros e mais de 3000 espécies descritas. São conhecidas mais de 3500 espécies classificadas em 95 gêneros distribuídos por todo o planeta. (FORATTINI, 2002).

O gênero *Culex*, pertence à tribo Culicini, sendo o maior gênero em número de espécies da família Culicidae com 26 subgêneros e 763 espécies (HARBACH, 2007). A maior parte das espécies da região Neotropical pertence ao subgênero *Culex* e *Melanoconion* e possuem

grande importância epidemiológica por representar os principais vetores de algumas arboviroses (FORATTINI, 2002).

As relações filogenéticas relacionadas ao subgênero *Culex* permanecem incertas devido às formas e características polimórficas destes dípteros (HARBACH, 2007). Além disso, a identificação dos adultos deste subgênero é dificultada pelo fato das fêmeas serem morfológicamente semelhantes, sem características marcantes evidentes.

A genitália dos machos é o método mais utilizado para identificação por espécies (FORATTINI, 2002). Além disso, este subgênero é dividido em Complexos constituídos por espécies morfológicamente muito semelhantes e até mesmo indistinguíveis, dificultando sua identificação. O subgênero *Culex* têm dois complexos de grande importância epidemiológica: o Complexo *Pipens* (*Cx. quinquefasciatus*, *Culex pipens*, *Culex australicus*, *Culex palens* e *Culex nigripalpus*) e o complexo Coronator (*Culex coronator*, *Culex ousqua*, *Culex usquatus* e *Culex camposi*) (DEMARI, 2009).

O grupo *Pipens* têm como principais representantes a espécie *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*, caracterizados pela sua forma alar ter escudo marrom com escamas douradas, tarsos escuros, palpos com escama branca no ápice, tergito com seguimentos abdominais apresentando manchas brancas, esternito recoberto com escamas brancas e occipício recoberto por escamas forquilhadas brancas com escamas antero-lateral, preta nas laterais e posteriores.

A espécie *Cx. quinquefasciatus* tem distribuição geográfica cosmopolita em regiões tropicais e subtropicais, hábitos de estreita relação com o homem apresentando índices elevados de domiciliação (FORATTINI, 2002). *Culex nigripalpus* tem distribuição principalmente nas Américas, em regiões de matas residuais e em áreas abertas, com forte adaptação para ambientes alterados pelo homem (FORATTINI, 2002). Ao contrário de *Cx. quinquefasciatus*, que tem baixa sinantropia com os hospedeiros, apesar de também ocupar ambientes modificados pela ação humana (FORATTINI, 1985). Em ambas as espécies, são observados um comportamento alimentar oportunista (DEMARI, 2009).

2.5. *Plasmodium* spp.: agente etiológico

O ciclo biológico do gênero *Plasmodium* é heteroxeno, composto por um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado. É constituído por três fases: fase exoeritrocítica, fase eritrocítica e fase esporogônica (que ocorre no mosquito). Os dípteros infectados por *Plasmodium* spp. inoculam esporozoítos que penetram nos macrófagos endoteliais onde dão origem aos esquizontes pré-eritrocíticos contendo diversos criptozoítos. Estes criptozoítos penetram principalmente em células endoteliais do fígado, baço, cérebro e medula óssea

realizando a segunda esquizogonia e originando os esquizontes, contendo metacriptozoítos, esta fase caracteriza-se por ser a etapa exoeritrocítica (PARAENSE *et al.*, 1949).

Os metacriptozoítos penetram nas hemácias e se desenvolvem por merogonia originando os fanerozoítos que invadem outros eritrócitos na circulação sanguínea. Parte dos fanerozoítos, também penetram nas células reticulares e dão origem a outras gerações de fanerozoítos. No interior dos eritrócitos se diferenciam em trofozoítos, que já foram identificados parasitando também leucócitos e trombócitos (SOARES, 1999). Estes trofozoítos se diferenciam em esquizontes contendo de 2 a 8 merozoítos. Os esquizontes irão se romper liberando os merozoítos das hemácias, para posterior penetração em outras hemácias onde se reproduzirão assexuadamente dando prosseguimento ao ciclo esquizogônico da fase eritrocítica (VALKIUNAS, 2005).

Após a fase eritrocítica, alguns merozoítos exibem diferenciação sexuada, originando microgametócitos e macrogametócitos. A fase esporogônica é desencadeada quando o vetor se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado, ingerindo esses gametócitos. No trato digestivo do vetor, os gametócitos atravessam a membrana das hemácias, liberando os gametas (GARNHAN, 1966). Nesse contexto, ocorre a exflagelação dos microgametas e a fecundação pelos macrogametas, gerando zigotos. Esses zigotos então se desenvolvem em oocinetos, que penetram a parede do estômago do vetor. O processo subsequente envolve a multiplicação assexuada por meio da esporogonia, levando à formação de oocistos que contêm esporozoítos. Esses esporozoítos emergem ao romper a parede do oocisto e ficam livres na cavidade celomática do vetor. Dessa forma, a fase esporogônica do ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito culmina na formação de oocistos que abrigam esporozoítos, os quais estarão prontos para serem transmitidos a novos hospedeiros vertebrados (BENNETT *et al.*, 1966) (Figura 1).

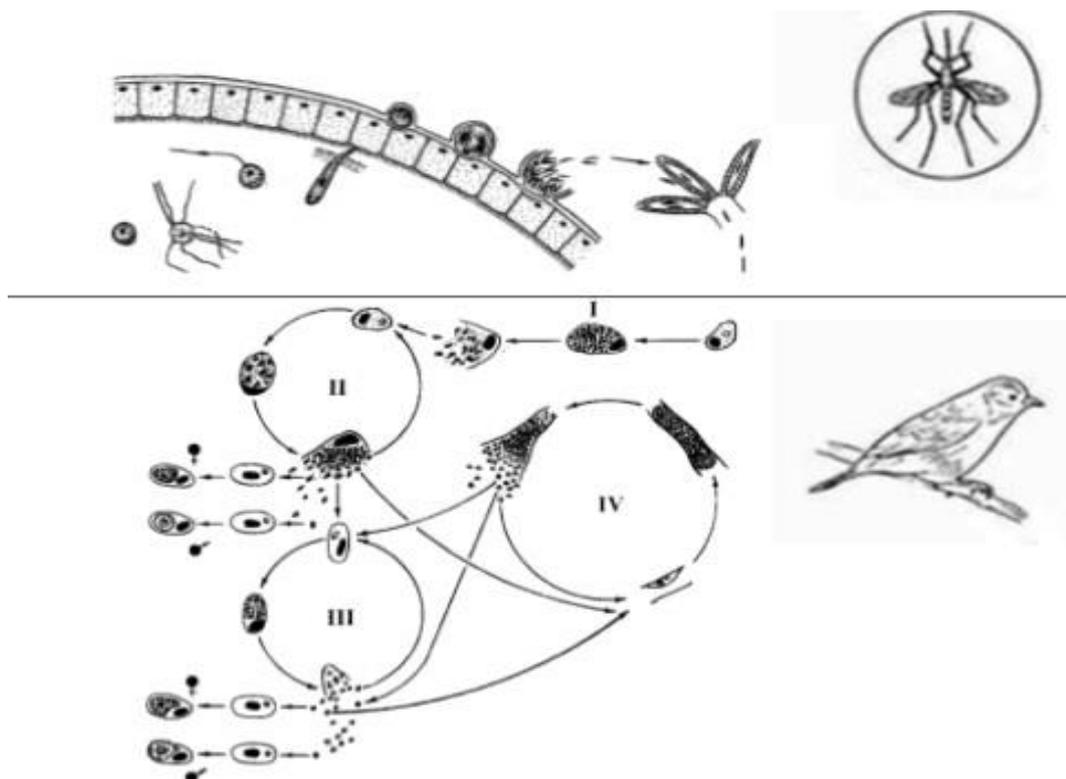


Figura 1. Ciclo biológico do parasito *Plasmodium* spp., no hospedeiro vertebrado e invertebrado. I e II representa a merogonia exo-eritrócítica primária, III ciclo eritrócítico e IV merogonia exo-eritrócítica secundária. Fonte: VALKIUNAS, 2005.

2.6. Métodos diagnósticos de *Plasmodium* spp. em aves

O principal método de diagnóstico da malária aviária é a identificação morfológica do parasito através de microscopia em esfregaços sanguíneos de aves (VALKIŪNAS 2005). Esta técnica é de fácil realização e baixo custo, porém tem diagnóstico pouco sensível e ocorrência de diagnóstico falso negativo em animais com baixa parasitemia (ATKISON, VAN RIPER III, 1991). Além disso, a visualização dos parasitos em microscopia óptica requer capacitação e experiência do profissional responsável pela análise e confecção dos esfregaços (BARKER *et al.*, 1992).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível tornar o diagnóstico destes hemoprotozoários mais sensível, quando comparada com a técnica de esfregaço sanguíneo (RIBEIRO *et al.*, 2005). Algumas técnicas de PCR desenvolvidas para o diagnóstico do gênero *Plasmodium* spp. em aves, também detectam simultaneamente a infecção das aves por outros Haemosporidas, como o gênero *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* utilizando apenas um par de oligonucleotídeos (BEADELL, FLEISHER, 2005).

Através da técnica de *Nested* PCR (nPCR) desenvolvida por Hellgren *et al.* (2004) foi possível detectar e diferenciar cada um destes Haemosporidas, utilizando oligoiniciadores específicos na segunda reação, para cada gênero, que ampliam ainda mais a sensibilidade para a detecção de um destes parasitos em amostras de DNA de sangue. Entretanto, a realização de técnicas de diagnóstico em sistema aberto aumenta a possibilidade de ocorrência de contaminações gerando diagnósticos falso positivos. Além disso, através da nPCR, pode ocorrer uma amplificação seletiva do fragmento de DNA específico para um dos gêneros testados, diminuindo desta forma a sensibilidade da técnica em amostras com infecções mistas (VALKIUNAS *et al.*, 2006).

Para diminuir os riscos de contaminação, a técnica de PCR em tempo real, também conhecida como qPCR, oferece diversas vantagens significativas para a detecção de patógenos transmitidos por vetores. Essa técnica é menos propensa a contaminações, uma vez que a amplificação é monitorada em tubos fechados, minimizando a possibilidade de introdução de DNA externo. A capacidade de diferenciar espécies ou variantes do patógeno é outra vantagem importante da qPCR, possibilitando uma análise detalhada da diversidade genética e potenciais mudanças na população de patógenos transmitidos por vetores. Essas características fazem da qPCR uma ferramenta valiosa no campo da vigilância epidemiológica, identificando infecções naturais de vetores, contribuindo para estratégias mais eficazes de controle e prevenção (FIGUEIREDO, 2021).

CAPÍTULO I

ASPECTOS ECOLÓGICOS E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Plasmodium* spp. EM MOSQUITOS DO GÊNERO *Culex* CAPTURADOS EM PERIDOMICÍLIOS DO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

VILELA, Thamyris Sampaio. **Padronização de técnicas moleculares para o estudo da interação *Culex* sp. e *Plasmodium* spp. e aspectos ecológicos de culicídeos, capturados no município de Seropédica, Rio de Janeiro.** 2019. 91p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

RESUMO

Os dípteros do gênero *Culex* são os principais vetores da malária aviária, transmitindo hemoparasitos do gênero *Plasmodium*, principalmente em aves domésticas. Estudos sobre patógenos veiculados por vetores, apontam três fatores-chave que afetam a prevalência desses agentes em mosquitos: susceptibilidade à infecção e capacidade de transmissão, variando entre diferentes espécies de mosquitos; a expectativa de vida do mosquito, que influencia a probabilidade de transmissão a novos hospedeiros; e o comportamento alimentar do mosquito, determinando as taxas de contato com vertebrados infectados e suscetíveis. Este estudo buscou detectar *Plasmodium* em mosquitos *Culex* e investigar seus aspectos ecológicos. Usando técnicas moleculares padronizadas, como a PCR em tempo real (qPCR), identificou a presença do parasita *Plasmodium* spp. nos mosquitos *Culex*, com o intuito de entender a possível interação entre esses organismos. O estudo foi conduzido no município de Seropédica, em quatro bairros: Valão das Louças, São Miguel, Santa Sofia e Campo Lindo. Para capturar os mosquitos, foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC, posicionadas nas proximidades dos galinheiros das residências. Os mosquitos capturados foram classificados de acordo com o gênero, identificados por meio de uma chave dicotômica de culicídeos, bem como separados por sexo e avaliados quanto ao grau de alimentação. O DNA das fêmeas que se alimentaram foi extraído seguindo o método padronizado de *Salting out*. As amostras foram submetidas à técnica de PCR em tempo real para a detecção do DNA de *Plasmodium* sp. Os dados climáticos utilizados para as análises foram coletados mensalmente no site do instituto de meteorologia (INMET). Os índices ecológicos avaliados foram índice de diversidade Simpson (D), índice de diversidade de Shannon (H), o índice de uniformidade de Pielou (J), e o índice de dominância Margalef (d) calculados no software PAST 3.17. Para avaliar a relação entre a quantidade de mosquitos de cada gênero e as áreas rurais e periurbanas, empregamos o teste de Mann-Whitney. Para examinar a associação entre a quantidade de mosquitos e os bairros onde foram coletados, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram conduzidas no software BioEstat 5.0, com um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Foram coletados espécimes do gênero *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, sendo 76,82% (2175) representado por *Culex* sp. O maior índice de diversidade de Shannon foi registrado em Valão das Louças ($H= 0,3095$), sendo uma área rural. O mês de dezembro apresentou maior umidade (91%) e o maior número de espécimes capturados. Foi detectado em 68,33% das fêmeas alimentadas o DNA de *Plasmodium* sp. As condições climáticas e as áreas de captura apresentam grande influência na presença dos vetores da *Plasmodium* sp., causador da malária aviária. Além disso, a alta taxa de mosquitos infectados próximas aos galinheiros indica a presença do ciclo da doença instalado nessas regiões, sendo fundamental adoção de medidas de controle de vetores para diminuir os riscos de transmissão da doença.

Palavras-chave: Ecologia, malária, PCR, vetores.

VILELA, Thamyris Sampaio. **Standardization of molecular techniques for studying the interaction between *Culex* sp. and *Plasmodium* spp., and ecological aspects of culicids, captured in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro.** 2019. 91p. Thesis (Doctor of Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

ABSTRACT

Diptera of the *Culex* genus are the main vectors of avian malaria, transmitting hemoparasites of the *Plasmodium* genus, primarily in domestic birds. Studies on vector-borne pathogens point out three key factors that affect the prevalence of these agents in mosquitoes: susceptibility to infection and transmission capacity, which varies among different mosquito species; mosquito lifespan, which influences the likelihood of transmission to new hosts; and mosquito feeding behavior, determining contact rates with infected and susceptible vertebrates. This study aimed to detect *Plasmodium* genus in *Culex* mosquitoes and investigate their ecological aspects. Using standardized molecular techniques such as real-time PCR (qPCR), the presence of the *Plasmodium* sp. parasite in *Culex* mosquitoes was identified to understand the potential interaction between these organisms. The study was conducted in the municipality of Seropédica, in four neighborhoods: Valão das Louças, São Miguel, Santa Sofia, and Campo Lindo. To capture mosquitoes, CDC-type light traps were placed near residential chicken coops. The captured mosquitoes were classified by gender and evaluated for feeding status after being identified by genus using a dichotomous key for culicids. DNA from feeding females was extracted using the standardized Salting out method. Samples were subjected to real-time PCR to detect *Plasmodium* sp. DNA. Climatic data used for analyses were collected monthly from the meteorological institute (INMET) website. The ecological indices evaluated included Simpson's diversity index (D), Shannon's diversity index (H), Pielou's evenness index (J), and Margalef's dominance index (d), calculated using PAST 3.17 software. To assess the relationship between the quantity of mosquitoes of each genus and rural and peri-urban areas, the Mann-Whitney test was employed. The Kruskal-Wallis test was used to examine the association between the quantity of mosquitoes and the neighborhoods where they were collected. All analyses were conducted using BioEstat 5.0 software, with a significance level of 95% ($p \leq 0.05$). Specimens from the *Anopheles*, *Aedes*, and *Culex* genera were collected, with *Culex* sp. representing 76.82% (2175) of the total. The highest Shannon's diversity index was recorded in Valão das Louças ($H = 0.3095$), which is a rural area. December had the highest humidity (91%) and the highest number of captured specimens. *Plasmodium* sp. DNA was detected in 68.33% of the feeding females. Climatic conditions and capture areas greatly influence the presence of *Plasmodium* sp. vectors, the causative agent of avian malaria. Furthermore, the high rate of infected mosquitoes near chicken coops indicates the presence of the disease cycle in these regions, making vector control measures essential to reduce disease transmission risks.

Keywords: Ecology, malaria, PCR, vectors.

1. INTRODUÇÃO

O principal vetor responsável pela transmissão da malária aviária são os dípteros do gênero *Culex*. Geralmente, a infecção causada por este parasito é subclínica, porém, recaídas podem ocorrer em condições de estresse ou na prevalência de infecções concomitantes com outros agentes de doença, causando prejuízos econômicos a indústria avícola. Diversas espécies do patógeno causador da doença podem ser transmitidos por estes dípteros, infectando vários hospedeiros vertebrados, favorecendo a detecção do parasito em amostras de vetores coletados a campo. Os hemoparasitos causadores da malária aviária são as espécies dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Entretanto, somente o do gênero *Plasmodium* pode ser vetorizado por *Culex*

Culicídeos da tribo Culicini apresentam grande adaptação antropofílica, facilitando a transmissão de patógenos para os homens e os animais com os quais convive. A existência de criações rústicas de animais em locais com grande incidência deste vetor favorece a dinâmica de transmissão de patógenos, incluindo a malária aviária, que ainda é pouco explorada em estudos. Isso se deve ao fato de que os dípteros transmissores do agente etiológico causador da doença têm morfologia complexa e muito semelhante entre espécies, dificultado sua identificação.

O mesmo ocorre com *Plasmodium juxtannucleare*, o principal agente causador da malária aviária no Brasil em infecções naturais. Este parasito apresenta tamanho reduzido quando comparado às outras espécies do gênero, que também são causadoras da malária, exigindo do patologista experiência para elaboração dos esfregaços sanguíneos e realização do diagnóstico das espécies. O uso mais frequente de ferramentas moleculares tem melhorado significativamente a capacidade de caracterizar as redes de transmissão de hemoparasitos aviários, pois permitem o acesso ao material genético, possibilitando análises mais sensíveis e específicas que as antes disponíveis na literatura.

Estudos de patógenos transmitidos por vetores para humanos e modelos de patógenos indicam que três fatores principais devem afetar a prevalência de agentes patogênicos em mosquitos: susceptibilidade à infecção e capacidade de transmissão distinta, de acordo com as diferentes espécies de mosquitos; a vida útil do mosquito, que influencia a probabilidade de transmissão a novos hospedeiros; e o comportamento alimentar do mosquito, que determina taxas de contato com os vertebrados infectados e suscetíveis. Além de fatores e variáveis bióticas importantes que podem ser determinantes no desenvolvimento e reprodução do vetor.

O presente estudo teve como objetivo a detecção de *Plasmodium* em mosquitos do gênero *Culex*, além de investigar os aspectos ecológicos desses vetores. Por meio da aplicação de técnicas moleculares padronizadas, utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR), buscou-se identificar a presença do parasito *Plasmodium* spp. nos mosquitos *Culex*, visando entender a possível interação entre esses organismos. Além disso, uma análise abrangente dos aspectos ecológicos dos culicídeos foi realizada, com foco especial na região do município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. O estudo busca contribuir para um melhor entendimento das dinâmicas de transmissão de doenças transmitidas por vetores, bem como para o conhecimento mais amplo dos padrões ecológicos desses insetos em uma área geográfica específica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado no município de Seropédica, localizado no estado do Rio de Janeiro, no período entre junho de 2016 e julho de 2017. As áreas de estudo consistiam em ambientes peridomiciliares com criações rústicas de aves domésticas (*Gallus gallus*), em áreas rurais e urbanas. Os bairros localizados nas áreas rurais, apresentavam uma vegetação bastante densa, favorecendo a proliferação de insetos. As áreas periurbanas apresentavam grande degradação ambiental e vegetação modificada, próximas aos areais do município vizinho (Tabela 1).

Tabela 1. Locais de coleta identificados pelo bairro, a concentração populacional de humanos, a presença de vegetação densa e a classificação de zona em rural ou urbana.

Bairro	Concentração populacional	Presença de vegetação	Classificação (Zona)
Campo Lindo	Alta	Residual	Urbana
Valão das Louças	Baixa	Dominante	Rural
São Miguel	Moderada	Moderada	Rural
Santa Sofia	Baixa	Dominante	Rural

2.2. Coleta de Amostras

Os mosquitos foram capturados utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC (Figura 2) em ambiente peridomiciliares, que permaneceram em funcionamento no período entre 18h00 e 6h00, durante três dias consecutivos, uma semana por mês. Os mosquitos foram capturados em 22 pontos de coletas distintos escolhidos de acordo com a presença de criação rústica de aves domésticas. Os pontos de coletas foram catalogados geograficamente (Anexo I) de forma que fossem divididos em duas zonas: Rural e urbana contendo 11 pontos de coleta cada.

A captura dos mosquitos foi realizada com a autorização dos proprietários dos imóveis. Os mosquitos foram levados vivos ao laboratório, onde foi feita a eutanásia por refrigeração entre 2 e 8°C. Foram então colocados em um pedaço de papel de filtro numa placa de Petri sobre gelo contendo solução fisiológica de NaCl 0,9%, e separados por sexo, estado alimentar e gênero. A identificação dos mosquitos foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópio utilizando chaves taxonômicas adequadas (BECKER *et al.*, 2010).

As fêmeas alimentadas foram identificadas visualmente por seus abdomens vermelhos e dilatados, sendo armazenadas individualmente em solução de RNA Later® a -20° C até o momento das análises moleculares. Fêmeas em jejum foram agrupadas em *pools* contendo 1-10 mosquitos de acordo com o gênero, data e local de coleta. Cada *pool* foi armazenado a -20°C até o momento das análises moleculares. Os gêneros *Aedes* e *Anopheles* foram diferenciados através da chave dicotômica de espécies propostas respectivamente por Forattini (1965), Berlin (1969) e Gorhan *et al.* (1967). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) da UFRRJ.



Figura 2. Armadilha do tipo CDC luminosa próxima a gaiola com aves.

2.3. Tamanho da amostra

Para a determinação do tamanho da amostra foram considerados os parâmetros de uma população infinita para um nível de prevalência desejado, baseando-se em um erro amostral de 50%, de acordo com Fulgêncio (2006) utilizando a fórmula:

$$n = \frac{p (100 - p) \cdot \alpha^2}{(d \cdot p / 100)^2}$$

Sendo: n = número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita;

p = prevalência esperada;

α^2 = fator determinante do grau de confiança;

d = erro amostral.

2.4. Coleta de dados climáticos

Os dados climáticos utilizados para as análises foram coletados mensalmente no site do instituto de meteorologia (INMET). Estes dados foram gerados diariamente, de hora em hora, nos horários entre 18:00h e 6:00h, em uma estação meteorológica de superfície automática, ligada a vários sensores de parâmetros meteorológicos. Esta estação encontra-se na Ecologia Agrícola da UFRRJ localizada em Seropédica.

2.5. Índices ecológicos

A diversidade e abundância das espécies de dípteros coletados foram calculadas utilizando índices ecológicos como: taxa que representa o número de espécimes de cada gênero dentro da localidade (S), número de indivíduos (N), índice de diversidade Simpson (D), índice de diversidade de Shannon (H), o índice de uniformidade de Pielou (J), e o índice de dominância Margalef (d) que foram calculados no *software* PAST 3.17.

O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever a qual espécie pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor a diversidade da amostra. Já o índice de Simpson é um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na localidade pertencerem à mesma espécie, quanto maior o valor, maior a dominância e menor a diversidade (URAMOTO *et al.*, 2005). A uniformidade de Pielou representa a máxima diversidade, permitindo representar a uniformidade de distribuição dos indivíduos entre todas as espécies existentes (MAGURRAN, 1988). O índice de Margalef é uma métrica comum para avaliar a diversidade de espécies em uma comunidade, considerando tanto o número de espécies quanto a abundância relativa delas.

2.6. Teste dos protocolos de extração de DNA genômico dos mosquitos

Foram testados 4 protocolos distintos para extração de DNA nas amostras de dípteros: método de *Hotshot* (LA PUENTE, 2013); *Fenol clorofórmio* (SANTOLIN, 2014); protocolo *Salting Out* (AYRES *et al.*, 2002) e protocolo pelo *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen®).

Para cada teste foram utilizados 1 controle negativo (macho), 2 controles fêmeas ingurgitadas com sangue e 2 controles fêmeas sem alimentação sanguínea. Após a realização dos testes de extração, o DNA extraído foi quantificado pela espectrofotometria, realizada no Nanodrop®. Para cada protocolo de extração de DNA testado foram utilizadas 3 fêmeas não ingurgitadas (sem presença visual de sangue no abdômen), 3 fêmeas ingurgitadas (identificadas por seus abdomens vermelhos) e 1 macho para controle negativo. Todos os

exemplares cujo DNA foi extraído foram identificados através de chave dicotômica Berlin e Belkin (1980) como sendo do gênero *Culex*. Os protocolos foram realizados de acordo com o fabricante ou recomendações dos autores.

2.7. Verificação da qualidade do DNA genômico

Após cada extração as amostras foram quantificadas e analisadas quanto a pureza em espectrofotômetro e posteriormente foi verificado a eficácia da técnica através da realização de uma reação em cadeia de polimerase (PCR) do tipo convencional utilizando os primers CoIF (-5'GGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTT-3') e CoIR(-5'AAAAATTTTAATTCAGTTGGAACAGC-3'), com alvo no gene *CoI*. As reações foram realizadas com volume final de 12,5µl, contendo 1x PCR tampão, 2,5mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,5mM de cada oligoiniciador, 1U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®). As condições de termociclagem foram de 94°C por 3 minutos para temperatura inicial de desnaturação, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos por 35 ciclos.

2.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de DNA amplificados pela PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x. Um volume de 10 µL dos produtos de PCR homogeneizados juntamente com 2,0 µl de tampão de corrida utilizado na eletroforese. O marcador de massa molecular utilizado foi o DNA Ladder 100pb (Invitrogen®). As eletroforeses foram conduzidas em cuba a 75V, durante 50 minutos. Após as corridas, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio e os produtos visualizados em transiluminador de UV, com 658 pares de bases.

2.9. Ensaio de PCR em tempo real para detecção de *Plasmodium* spp.

As reações de qPCR para *Plasmodium* spp. foram realizadas no aparelho Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) utilizando os oligoiniciadores 18SPJF (5'CACAAGGAAGTTTGAGGCAACA-3') e 18SPJR (5'-CGCGTGCAGCCTAGTTTATCT-3'), para o gene 18SrDNA e sonda (5'TAAGGAAGTTTGAGGCAA 3') que amplificam produtos de 62pb também desenhados nas mesmas condições citadas acima. O volume final da reação foi de 20µL, contendo: 5x PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 300nM de cada oligoiniciador do 18S rDNA e

300ng das amostras de DNA total. As condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto.

2.10. Ensaio de PCR convencional para sequenciamento e diferenciação de espécies de *Culex* sp. positivas para *Plasmodium* spp.

As mesmas amostras positivas no ensaio de qPCR pra *Plasmodium* sp. foram submetidas a uma PCR do tipo convencional com alvo no gene citocromo oxidase subunidade I (COI) para estabelecer as correlações filogenéticas entre o vetor e o parasito em questão neste estudo. A reação foi novamente realizada utilizando os primers CoIF – (-5'GGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTT-3') e CoIR – (-5'AAAATT TTAATTCCAGTTGGAACAGC-3'). As reações foram realizadas com volume final de 25µl, contendo 1x PCR tampão 2.5mM MgCl₂, 0.2mM de cada desoxinucleotídeos, 0.5mM de cada oligoiniciador, 1U *Taq* platinum. As condições de termociclagem foram de 94°C por 3 minutos para temperatura inicial de desnaturação, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos dessa reação foram submetidos a eletroforese, conforme o item 2.8.

3.11. Análise Estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados os dados de coleta de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* como quantidade, sexo e gêneros identificados, dados climáticos e condições do ambiente de cada região. Foi realizada a análise exploratória dos dados para verificar a correlação entre os gêneros e os dados climáticos utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Para verificar a associação entre a quantidade de cada gênero e as áreas rurais e periurbanas foi utilizado o teste Mann-Whitney. Este teste também foi utilizado para verificar se havia associação significativa entre a quantidade de *Culex* sp. coletados e as épocas de seca e de chuvas. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar associação entre a quantidade de dípteros e os bairros de coleta. As análises foram realizadas no *software* BioEstat 5.0, com um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Dípteros coletados e caracterização da área de estudo

As coletas foram realizadas no período de agosto de 2016 a julho de 2017 (Figura 3) e resultou 2831 mosquitos capturados durante este período (Anexo II). Dentre os gêneros capturados podemos citar *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, sendo este último mais abundante que os demais (Tabela 2), abrangendo cerca de 96,49% do montante de dípteros coletados.



Figura 3. Presença de hospedeiros de *Culex* sp. em ponto de coleta em área urbana, no Bairro Campo Limpo, em Seropédica, Rio de Janeiro.

Tabela 2. Frequência dos gêneros identificados entre os espécimes de dípteros coletados em áreas peridomiciliares com presença de aves.

<i>Culex</i> sp. ♀	<i>Culex</i> sp. ♂	<i>Aedes</i> sp. ♀	<i>Aedes</i> sp. ♂	<i>Anopheles</i> sp. ♀	<i>Anopheles</i> sp. ♂
76,82% (2175)	19,67% (557)	2,01% (57)	0,45% (13)	0,7% (20)	0,6% (17)

As espécies de *Aedes* identificadas foram *Aedes aegypti* (70%), *Aedes albopictus* (21%), *Aedes albifasciatus* (9%) e no gênero *Anopheles* a espécie *Anopheles aquasalis* (19,35%). As demais análises foram realizadas somente sobre os espécimes do gênero *Culex* afim de identificar as fontes alimentares destes dípteros e a correlação com infecções por *Plasmodium* spp. circulantes neste gênero

3.2. Resultados dos índices ecológicos

A diversidade dos gêneros variou de acordo com os locais de coleta. O maior índice de diversidade de Shannon foi registrado em Valão das Louças ($H= 0,3095$), indicando maior diversidade de espécies neste bairro, seguido por São Miguel ($H = 0,267$), ambos com características ambientais rurais, nos indicando que quanto menor a intervenção antropofílica em um determinado ambiente, maior será a diversidade e competição entre as espécies daquele nicho. A presença do homem no ambiente seleciona o mais apto às alterações antropofílicas, diminuindo a diversidade.

O bairro que apresentou o menor índice de Simpson foi Valão das Louças ($1-D= 0,1386$), indicando menor dominância e maior diversidade. O bairro que evidenciou a maior dominância sobre as demais espécies foi o bairro Campo Lindo ($D= 0,9734$), indicando que o gênero *Culex* possui melhor adaptação antropofílica quando comparado aos demais gênero encontrados neste estudo, uma vez que sua dominância foi encontrada no bairro com maiores características urbanas.

A região que apresentou o maior índice de equabilidade de Pielou foi Valão das Louças ($J = 0,9734$) seguido por São Miguel ($J = 0,2431$) e Santa Sofia ($J = 0,2243$) indicando que nestas regiões há maior distribuição e uniformidade entre os gêneros encontrados. A diversidade de Margalef apresentou maior índice no Valão das Louças ($d= 0,3761$) seguido por São Miguel ($d= 0,3182$).

Tabela 3. Índices ecológicos de dípteros capturados por armadilha luminosa CDC no período entre agosto de 2016 a julho de 2017, em áreas peridomiciliares no município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Índices	Valão das Louças	São Miguel	Campo Lindo	Santa Sofia
Taxa_S	3	3	3	3
Indivíduos	204	537	1114	924
Dominância_D	0,8614	0,8862	0,9734	0,8963
Simpson_1-D	0,1386	0,1138	0,02665	0,1037
Entropia Shannon_H	0,3095	0,267	0,07995	0,2464
Pielou_J	0,2817	0,2431	0,07277	0,2243
Diversidade Margalef	0,3761	0,3182	0,2851	0,2929

Foi analisada a ocorrência de dípteros ao longo dos 12 meses de coleta e avaliada a diferença da ocorrência entre os gêneros encontrados. Dípteros do gênero *Culex* sp. apresentaram maior número de espécimes coletadas quando comparadas aos gêneros *Aedes* e

Anopheles (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quando comparado entre *Anopheles* e *Aedes* não houve diferença significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Foi realizada uma análise comparativa das áreas urbanas e rurais em relação a ocorrência de cada gênero. Em *Culex* sp. não foi observada diferença significativa (teste U de Mann-Whitney, $p = 0,0829$), sendo este fator indicativo da antropofilização do vetor e sua adaptação ao meio urbano. Os gêneros *Aedes* (teste U de Mann-Whitney, $p = 0,2917$) e *Anopheles* (teste U de Mann-Whitney, $p = 0,4087$) apresentaram diferença na ocorrência entre as diferentes áreas estudadas. As análises foram avaliadas a nível de significância de 95%.

Os hematozoários são fortemente impulsionados por fatores ambientais, como temperatura e umidade que podem limitar o desenvolvimento de parasitas ou distribuições de vetores (SEHGAL *et al.*, 2015). A correlação entre a quantidade de *Culex* e a temperatura foi positiva ($r_s = 0,0091$ $p = 0,7094$) (Figura 4) (Anexo III). A correlação entre a quantidade deste gênero e a umidade não foi significativa ($r_s = 0,1943$, $p = 0,1391$) (Figura 5). Por fim, a correlação entre a quantidade deste díptero e a pluviosidade foi positiva e não apresentou diferença significativa ($r_s = 0,543$, $p = 0,4173$) (Figura 6). Então é possível inferir que a captura de mosquitos do gênero *Culex* foi mais frequentes em meses cuja temperatura foi mais elevada, apresentando uma correlação positiva e diretamente proporcional a ocorrência de dípteros deste gênero, tendo seu pico máximo de espécimes coincidindo com os meses de maior temperatura (LAPOINTE *et al.*, 2012; SEHGAL *et al.*, 2015; CLARK *et al.*, 2016).

O mês de dezembro foi o mais úmido, com 91% de umidade média registrada e com o maior número de espécimes capturados ($n=391$), seguido pelos meses de maio ($n=283$) e novembro ($n=262$). Janeiro foi o segundo mês que mais foram capturados os dípteros do gênero *Culex*, porém quando avaliada umidade, se encontra uniformidade compatível com os avaliados anteriormente que possuíram um alto percentual. Quando avaliada a temperatura desses meses, observou-se que foram as médias de temperaturas mais intensas do ano. Ainda, destaca-se a maior ocorrência de chuvas nos mesmos períodos avaliados com maior ocorrência dos dípteros (TELFER *et al.*, 2010). Estatisticamente os fatores climáticos como umidade e pluviosidade não apresentaram correlações significativas a nível de 99% de confiança.

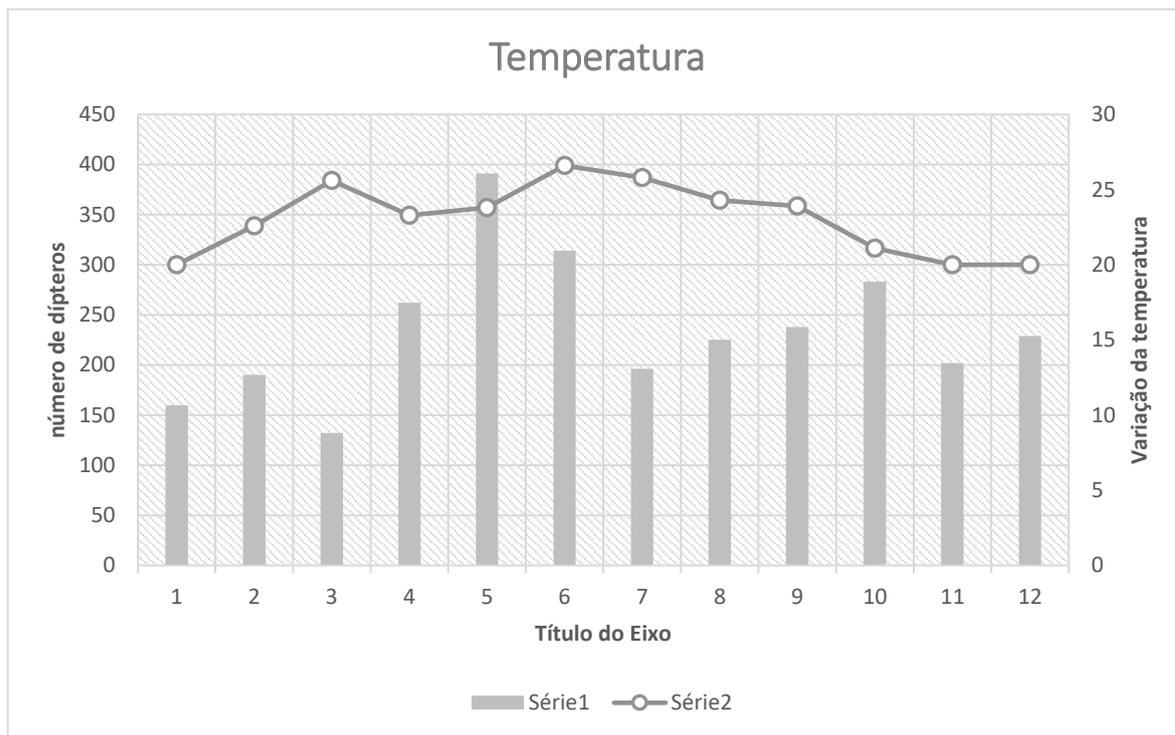


Figura 4. Temperatura média (°C) referente ao mês avaliado e número de culicídeos capturados durante o estudo realizado em Seropédica, RJ, entre os anos de 2016 e 2017.

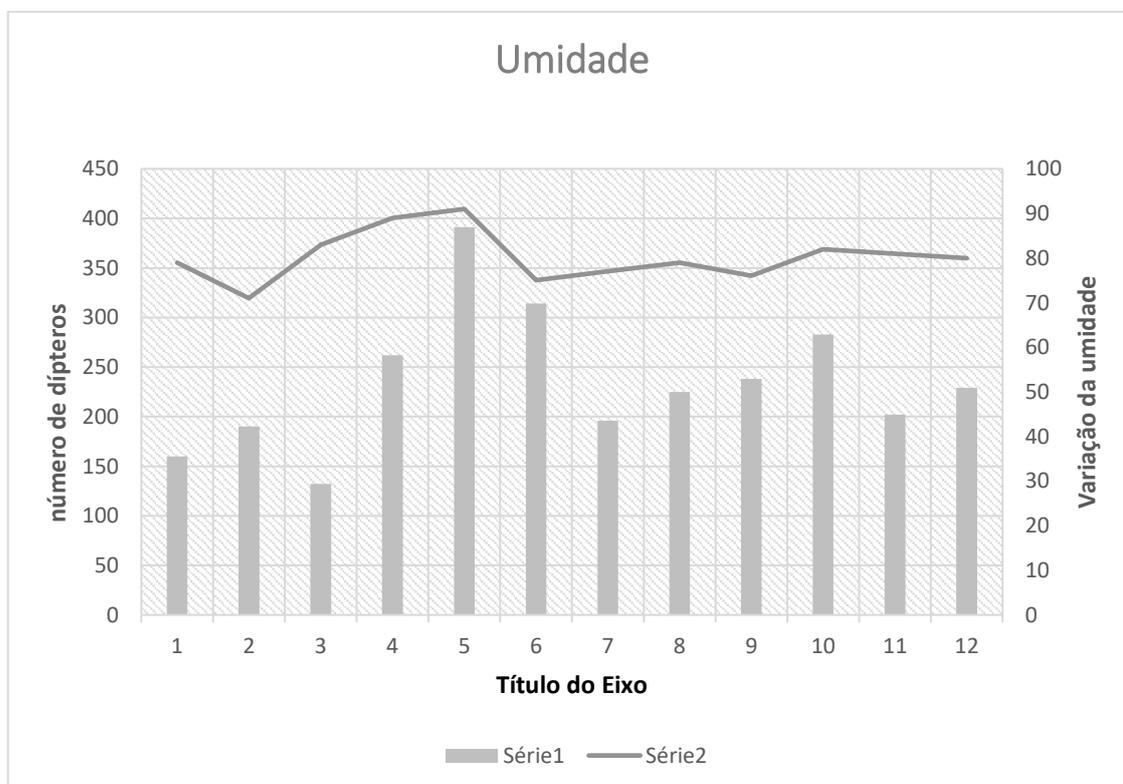


Figura 5. Umidade do ar média calculada para o mês e número de culicídeos capturados durante o estudo realizado em Seropédica, RJ, entre os anos de 2016 e 2017.

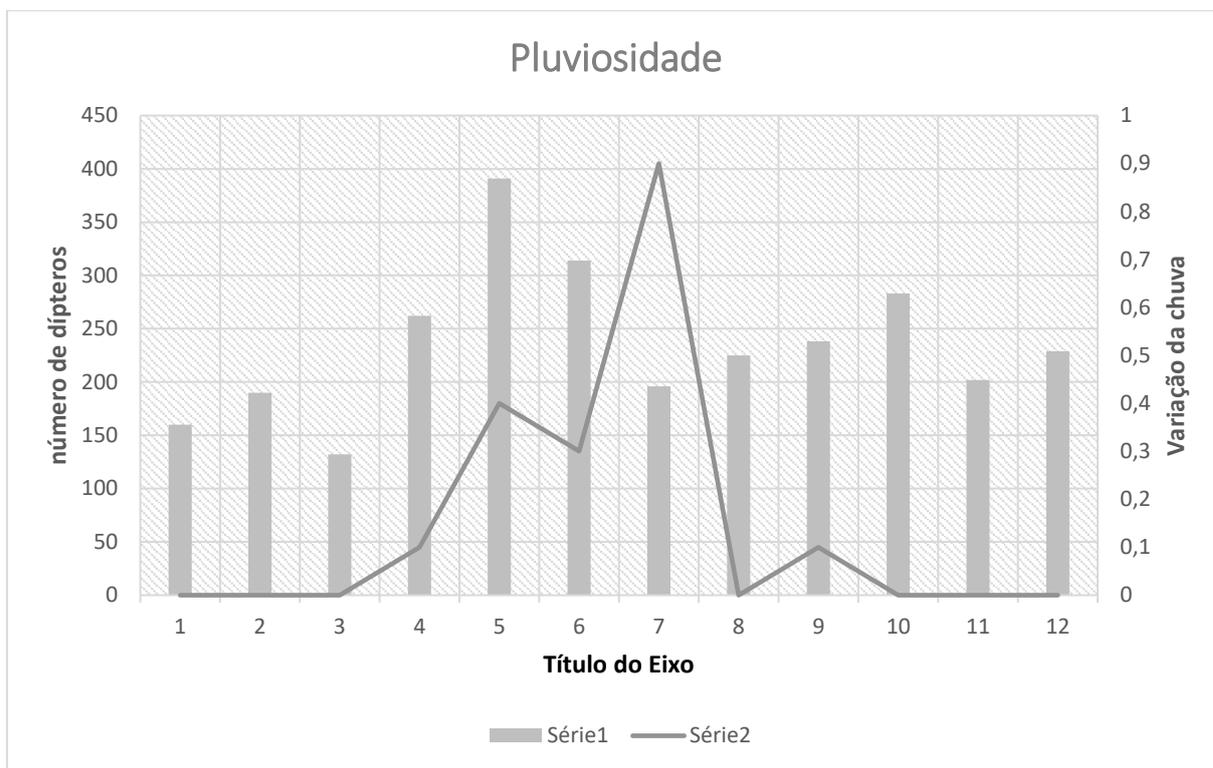


Figura 6. Pluviosidade média e número de culicídeos capturados durante o estudo realizado em Seropédica, RJ, entre os anos de 2016 e 2017.

3.3. Avaliação dos protocolos testados para extração de DNA genômico dos mosquitos

Os protocolos do kit *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen®) apresentaram quantificações satisfatórias, em que todas as amostras extraídas obtiveram concentração próxima ou superior a 20ng na avaliação por Nanodrop®, e, quando submetidos ao ensaio de PCR convencional com gene constitutivo COI, apresentaram amplificações. Esse protocolo não foi escolhido devido ao alto custo do kit de extração de DNA para o número de amostras testadas.

Quanto ao protocolo de extração utilizando o método de fenol-clorofórmio (SANTOLIN, 2014), não foram obtidos resultados satisfatórios em relação à quantificação por espectrofotometria, apresentando valores inferiores a 5ng e, conseqüentemente, no ensaio de PCR, nenhuma amostra extraída pelo teste apresentou produto de amplificação.

As amostras submetidas ao protocolo com base na técnica *HotShot* (LA PUENTE *et al.*, 2013) apresentaram elevadas quantificações quando submetidas ao Nanodrop®, e posteriormente quando submetidas ao ensaio de PCR para verificação da qualidade do DNA, apresentaram satisfatória amplificação. Entretanto, a amplificação foi realizada imediatamente após a extração de DNA. Por se tratar de uma extração de tubo único, sem a etapa de purificação, existem muitos inibidores que, com o tempo, acabam degradando a amostra, não

sendo o protocolo ideal para a realização de vários tipos de PCR. Como os objetivos do estudo requeriam análises futuras sobre vários parâmetros em uma mesma amostra, não se tornaria viável a utilização deste tipo de método de extração, apesar da rapidez e baixo custo da técnica.

O protocolo com base em *Salting out* apresentou quantificações satisfatórias próximas a 20ng e amplificações em todas as amostras testadas, sendo escolhido para a extração dos demais exemplares para futuros testes moleculares.

3.4. Execução do Protocolo de Eleição

Os mosquitos foram lavados com PBS 1x três vezes antes do início da extração genômica, para retirar o RNAlater® utilizado como crioprotetor. Foram extraídas 700 amostras de mosquitos do gênero *Culex* sp. identificadas anteriormente por chave dicotômica. O DNA genômico foi isolado de acordo com Ayres *et al.* 2002, com as seguintes adaptações abaixo, do cefalotórax de cada amostra para identificar a presença de parasitos sanguíneos no mosquito e fonte alimentar. As glândulas salivárias, previamente removidas, e o cefalotórax foram triturados com auxílio de bastão de vidro esterilizado e auto clavado em microtubos de 2,0ml contendo 500µL de tampão de lise celular (400mM de NaCl; 20mM Tris-HCl pH 8; EDTA 10mM pH 8,0; SDS a 1%), 15µL de proteinase K (20 mg/ml) e em seguida, mantida “overnight” em estufa seca a 60° C. Após a completa digestão o volume de 420µL de NaCl (5M) foi adicionado em cada tubo, em seguida as amostras foram homogeneizadas por agitação através do vórtex. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante (~550µL) foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml contendo volume igual de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas a -20°C durante 1 hora. Transcorrido esse período as amostras foram centrifugadas e o pellet formado lavado com etanol 70% e seco por inversão. Em seguida foi eluído com 50µL de tampão de eluição e armazenado a -20°C (AYRES *et al.*, 2002).

3.5. Resultado da qualidade do DNA genômico

Após as extrações de DNA utilizando o protocolo de Ayres *et al.* (2002) as amostras foram submetidas a uma reação de PCR do tipo convencional utilizando um gene alvo do gênero *Culex*, afim de verificar a qualidade do DNA extraído (Figuras 7 e 8). Confirmada a amplificação através do gel, as amostras foram padronizadas em 30 ng/µL, para as análises seguintes.

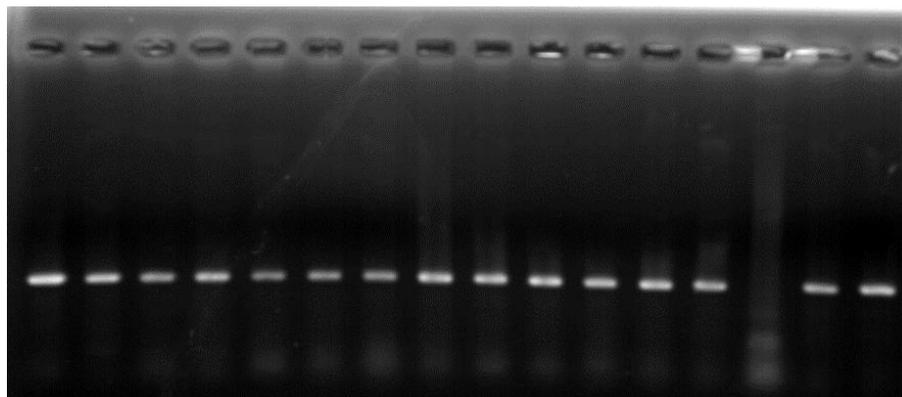


Figura 7 . Produtos de PCR convencional do gene *Col* (658pb) das amostras de DNA de mosquito extraídas pelo método *Salting Out* (AYRES *et al.*, 2002).

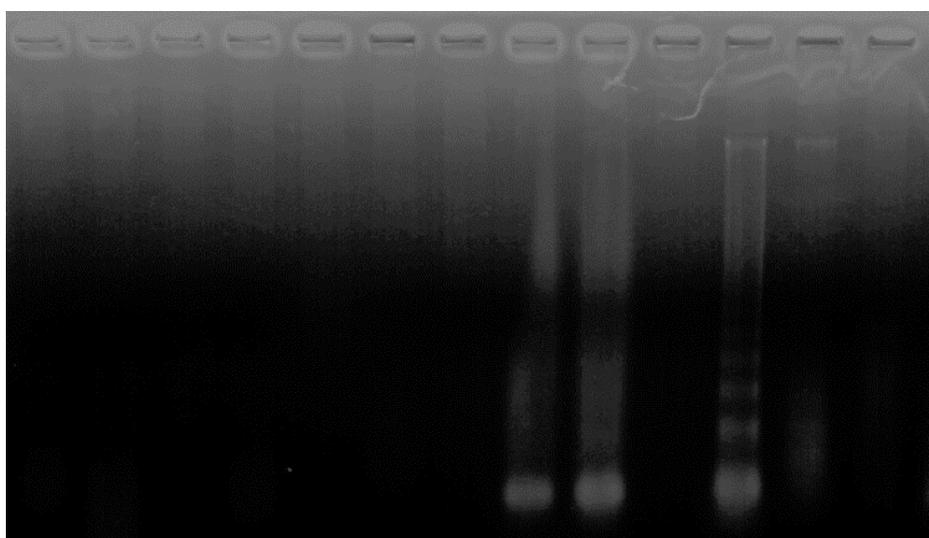


Figura 8. Produtos de PCR convencional do gene *Col* (658pb) das amostras de DNA de mosquito extraídas pelo método Fenol- clorofórmio e Kit Qiagen, respectivamente.

3.6. Resultados do ensaio de PCR em tempo real para detecção de *Plasmodium* spp.

As 300 amostras de fêmeas ingurgitadas de mosquito *Culex* sp. foram avaliadas pelo ensaio de qPCR utilizando-se o sistema de sondas Taqman que aumenta a especificidade da reação para detecção da infecção por *Plasmodium* spp. Esta amostragem incluiu não somente as amostras consideradas positivas para repastos sanguíneos realizados em galináceos como também todos os espécimes avaliados como negativos para alimentação em aves. Diante deste fato obtivemos os seguintes resultados: 68,33% dos espécimes avaliados foram positivos para infecção por *Plasmodium* spp. corroborando com estudos realizados no hospedeiro vertebrado (*Gallus gallus*) em 2015 por esta mesma equipe, onde foram encontrados 69,3% de hospedeiros vertebrados positivos nesta mesma região (Dados não publicados).

Quanto a correlação ambiental, não houve importância significativa na taxa de infecção de *Plasmodium* spp. nos espécimes avaliados uma vez que na zona rural foram encontrados uma taxa de infecção de 78,01%, enquanto na zona urbana observou-se uma taxa de 70,37% de positividade. Isso indica novamente a resposta adaptativa positiva do vetor a antropofilização do ambiente.

Avaliamos a correlação da ocorrência de *Plasmodium* spp. no decorrer das estações do ano. A maior taxa de positividade foi observada no mês de dezembro, seguido de novembro e maio, com taxas de 22,43, 14,2% e 11,2%, respectivamente. Quando avaliada a taxa de infecção dos espécimes encontrada neste estudo, observou-se que 74,27% dos mosquitos coletados estavam positivos para malária aviária através da qPCR. Estes resultados corroboram com a maior frequência do vetor nestes períodos citados, favorecido por condições climáticas que beneficiam o ciclo de vida do vetor e conseqüentemente do agente patogênico, como maiores taxas de umidade, maiores médias de temperatura e pluviosidade. Este método com sensibilidade aumentada permite o diagnóstico ainda que na presença de coinfeções difíceis de identificar usando apenas PCR convencional (CLARK *et al.*, 2016).

O sequenciamento das amostras tendo como alvo o gene Citocromo oxidase subunidade I resultou em proximidades de até 99% para a espécie *Culex nigripalpus* em 63% das amostras avaliadas e 47% das amostras demonstraram proximidade em suas seqüências para a espécie *Culex quinquefasciatus* dentro do grupo pipens com similaridades de até 94% entre as seqüências, indicando estas espécies como principais vetores de *Plasmodium* spp. Na área de estudo, estes resultados corroboram com Chen *et al.* (2015) que encontraram positividade da infecção em *Culex quinquefasciatus* reconhecendo o seu potencial de vetoração (CHEN *et al.*, 2015).

A técnica de qPCR além de ser mais sensível quando comparada as técnicas disponíveis na literatura, por utilizar fragmentos menores de oligoiniciadores o que facilita o anelamento do oligoiniciador ao fragmento alvo, ocorre em sistema fechado, tornando a execução da técnica mais rápida, eficiente e sem riscos de contaminações externas.

4. CONCLUSÕES

Este identificou várias espécies, incluindo *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes albifasciatus* e *Anopheles aquasalis*. Entre essas, o gênero *Culex* foi predominante nos locais de coleta. A pesquisa destacou a influência significativa das condições climáticas no ciclo de vida desses culicídeos, especialmente na dinâmica populacional. Foi observado que as populações de mosquitos aumentaram durante os meses mais quentes, úmidos e chuvosos, como dezembro, novembro e maio, com uma correlação positiva entre a frequência de mosquitos do gênero *Culex* e o aumento da temperatura ambiental, principalmente nas áreas rurais. As demais espécies de mosquitos relatadas neste estudo não apresentaram essa mesma correlação, possivelmente devido ao número reduzido de exemplares coletados desses gêneros. Além disso, foi evidenciada uma forte característica vetorial para *Plasmodium* sp., principalmente nas espécies *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*, demonstrando uma predileção desses mosquitos por fontes de repasto em aves, mesmo com a presença de outras espécies de animais disponíveis. Assim, é possível inferir que a captura de mosquitos do gênero *Culex* foi mais frequente em meses com temperaturas mais elevadas, apresentando uma correlação positiva e direta com a ocorrência de dípteros desse gênero, alcançando seu pico máximo de espécimes durante os meses mais quentes.

CAPÍTULO II
PADRONIZAÇÃO DE DOIS ENSAIOS MULTIPLEX DE PCR EM TEMPO REAL
PARA IDENTIFICAÇÃO DE FONTE ALIMENTARAR E IDENTIFICAÇÃO DA
FONTE DE REPASTO SANGUÍNEO EM CULICÍDEOS CAPTURADOS NO
MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO.

VILELA, Thamyris Sampaio. **Padronização de técnicas moleculares para o estudo da interação *Culex* sp. e *Plasmodium* spp. e aspectos ecológicos de culicídeos, capturados no município de Seropédica, Rio de Janeiro.** 2019. 91p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

RESUMO

O comportamento alimentar dos culicídeos é de extrema relevância, pois, enquanto os machos desse grupo se alimentam exclusivamente de néctar, as fêmeas adotam hábitos hematófagos para a maturação de seus ovos e o processo de oviposição, o que as leva a realizar repastos sanguíneos frequentes. Esse comportamento desempenha um papel fundamental na transmissão de diversas doenças. Os testes mais comuns para detectar fontes alimentares incluem o teste de preceptina e os testes imunoenzimáticos (ELISA). No entanto, com os avanços das técnicas moleculares, agora é possível detectar nanopartículas de DNA, exigindo volumes significativamente menores em comparação com as técnicas convencionais disponíveis. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma técnica para a detecção de múltiplos hospedeiros vertebrados, utilizados como possíveis fontes de repasto para mosquitos do gênero *Culex*. O DNA de seis espécies de animais vertebrados foi extraído para servir como controles positivos de possíveis fontes alimentadas pelas fêmeas de *Culex* spp.: cão, gato, cavalo, boi, humano e galinha. Os primers de cada espécie foram organizados em dois triplexes, para serem submetidos a uma reação multiplex de PCR em tempo real HRM. O DNA das fêmeas alimentadas foi extraído pelo protocolo *Salting out*, de acordo com as orientações do primeiro capítulo da presente tese. Os dados foram analisados por meta-análise de efeito fixo de Odds Ratio, no *software* BioEstat 5.0, em dois grupos: o grupo 1 referente às amostras de áreas rurais e o grupo 2 às amostras de áreas urbanas. Dentre os 92% dos mosquitos alimentados com sangue de galináceos 74,27% encontravam-se positivos para *Plasmodium* spp. As espécies de mosquitos alimentadas principalmente de aves estão mais expostas à infecção por espécies de plasmódios aviários. Foi observado que as áreas rurais apresentaram 8,89 vezes de ter espécimes alimentados por sangue de galinhas do que nas áreas urbanas. A técnica de qPCR HRM desenvolvida neste estudo apresenta vantagens significativas, pois permite uma avaliação mais rápida e precisa, sendo uma técnica de diagnóstico direto do alvo. Além disso, ela possibilita o diagnóstico de alimentações que envolvem mais de uma fonte de repasto, o que é crucial para compreender a complexidade das interações entre vetores e hospedeiros.

Palavras-chave: Fontes alimentares, , galinhas, Multiplex HRM, Padronização.

VILELA, Thamyris Sampaio. **Standardization of molecular techniques for studying the interaction between *Culex* sp. and *Plasmodium* spp., and ecological aspects of culicids, captured in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro.** 2019. 91p. Thesis (Doctor of Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

ABSTRACT

The feeding behavior of culicids is of utmost importance, as while males of this group exclusively feed on nectar, females adopt hematophagous habits for the maturation of their eggs and the oviposition process, leading them to engage in frequent blood meals. This behavior plays a fundamental role in the transmission of various diseases. The most common tests to detect food sources include the preceptin test and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). However, with the advances in molecular techniques, it is now possible to detect DNA nanoparticles, requiring significantly smaller volumes compared to conventional available techniques. The aim of this study was to develop a technique for the detection of multiple vertebrate hosts used as potential blood meal sources for mosquitoes of the *Culex* genus. DNA from six vertebrate animal species was extracted to serve as positive controls for potential blood sources for *Culex* spp.: dog, cat, horse, cattle, human, and chicken. Primers for each species were organized into two triplexes and subjected to a real-time HRM multiplex PCR reaction. The DNA from blood-fed females was extracted using the Salting out protocol, following the guidelines of the first chapter of this thesis. Data were analyzed using fixed-effects Odds Ratio meta-analysis in BioEstat 5.0 software, with two groups: group 1 referring to samples from rural areas and group 2 to samples from urban areas. Among the 92% of mosquitoes that fed on avian blood, 74.27% tested positive for *Plasmodium* spp. Mosquito species primarily feeding on birds are more exposed to infection by avian Plasmodium species. It was observed that rural areas had 8.89 times more specimens feeding on chicken blood than urban areas. The qPCR HRM technique developed in this study offers significant advantages, as it enables faster and more accurate evaluations, being a direct target diagnostic technique. Furthermore, it allows for the diagnosis of feedings that involve more than one blood source, which is crucial for understanding the complexity of interactions between vectors and hosts.

Keywords: Food sources, chickens, Multiplex HRM, Standardization.

1. INTRODUÇÃO

O hábito alimentar dos culicídeos necessita de atenção especial, pois, apesar dos machos deste gênero se alimentarem apenas de néctar, as fêmeas têm hábitos hematófagos para maturação dos ovos e oviposição, realizando repastos sanguíneos frequentes (LAPORTA, 2007). Mesmo sendo fitófagas facultativas, precisam de carboidratos e lipídios como fonte de energia para fase reprodutiva. Estudos indicam que fêmeas que se alimentam de sangue e néctar apresentam maior produção de ovos do que as que se alimentam apenas de sangue (MORAIS, 2011).

As espécies hematófagas podem apresentar diferentes graus de preferência por hospedeiros. Através de órgãos sensoriais as fêmeas procuram algumas partes do corpo com maior frequência e estes locais liberam compostos químicos que fazem com que haja maior atração para uma determinada espécie do que para outra (SHIRA *et al.*, 2002; CABRINI *et al.*, 2006). Várias classes de estímulos são emitidas por hospedeiros vertebrados para localização da fonte sanguínea por parte do díptero. Os estímulos voláteis, como o dióxido de carbono, (CO₂) são carregados pelo ar e detectados a certas distâncias pelos mosquitos, exercendo grande influência no inseto, pois é produzido em grande quantidade, comparado com outros estímulos, e é interpretado como a presença de hospedeiro (COOPER *et al.*, 2004). O ácido láctico e amônia presentes no suor humano também foram confirmados como fatores atrativos para fêmeas (BRAKS *et al.*, 2001). Esses estimulantes são denominados cairomônios, sendo substâncias interespecíficas de atração. Além dos compostos voláteis, as fêmeas conseguem detectar o calor e a umidade que, somados aos estímulos anteriores, fazem com que elas encontrem o hospedeiro específico. O primeiro estímulo detectado a distâncias maiores que 20m, são os cairomônios que fazem com que a fêmea inicie um vôo direcionado. Em distâncias entre 2 e 20m o CO₂ passa a ser detectado junto ao odor e quando distante 1 a 2m, além dos estímulos anteriores, soma-se o calor e a umidade do corpo. Esses fatores atrativos são mais bem detectados dependendo da direção e da velocidade do vento e do campo visual em que a fêmea está sobrevoando (KNOLS; MEIJERINK, 1997).

As fêmeas do gênero *Culex* sp. têm hábito hematófago noturno e durante o repasto sanguíneo, normalmente antecedido por uma fecundação, as peças bucais são introduzidas na pele do hospedeiro, e a saliva que contém anticoagulantes, aglutininas e substâncias alergênicas é inoculada (LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1984). Na maioria das vezes ocorre sucção direta de um capilar que se completa em aproximadamente três minutos. O volume

ingerido varia conforme a espécie: de 1,5 a 4,2 mm³ foram observados em *Ae. aegypti* e até 10,2 mm³ em *Cx. quinquefasciatus* (CLEMENTS, 1999).

Após o repasto sanguíneo as fêmeas têm o seu peso corporal aumentado em 3 a 4 vezes e, conseqüentemente, reduz a atividade de voo. Com isso busca abrigo em locais úmidos, escuros e sem ventilação para digerir o sangue até que ocorra a maturação dos ovos, em torno de 2 a 3 dias. Após essa etapa, a fêmea voa a procura de criadouros para realizar a oviposição. Ao localizá-lo deposita os ovos em forma de jangadas na superfície da água. A fêmea então inicia um novo ciclo reprodutivo que pode se repetir até que o mosquito morra pela idade ou por acidente. Em média uma fêmea adulta pode atingir até 2 meses de vida realizando 4 ou 5 ciclos reprodutivos e podem voar centenas de metros a partir dos criadouros dependendo da disponibilidade de fonte alimentar para realização do repasto. Essa característica é de grande importância em áreas nas quais ocorre a transmissão de patógenos. Estudos sobre o grupo *Pipens* indicam que *Cx. quinquefasciatus* tem hábitos alimentares com preferência em repastos realizados no homem, seguido de aves e canídeos (GOMES *et al.*, 2003; ZINSER *et al.*, 2004). Enquanto os hábitos alimentares de *Cx. nigripalpus* indicam que este díptero tem comportamento oportunista de acordo com a fonte alimentar disponível. No entanto, quando disponíveis diversas fontes de repasto, indicam predileção ornitófila (FORATTINI, 2002). Apesar de seu comportamento oportunista, alguns estudos indicaram que este díptero permanecia pousado por longo tempo na vegetação circundante antes de investirem sobre a isca humana, fortalecendo assim a sua preferência em se alimentar de aves (FORATTINI, 2002).

O hábito hematófago predispõe a ocorrência de infecções pelo vetor. Alguns hematozoários têm capacidade de alterar as características alimentares do vetor, fazendo com que este adquira predileção pelo hospedeiro vertebrado da espécie que o infecta, como é o caso do gênero *Plasmodium*. Essa adaptação evolutiva de comportamento pode ocorrer de formas diferentes, transformando os hospedeiros vertebrados infectados em alvos mais atraentes para vetores não infectados (KOELLA, 2002). Essa hipótese de manipulação, baseia-se na alteração do comportamento do hospedeiro, como, por exemplo, atividade reduzida e alterações fisiológicas, por exemplo, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia, que poderia potencialmente afetar a atração do mosquito manipulando o comportamento de vetores infectados e aumentando a taxa de picada dos vetores. Isso prejudica a capacidade de o vetor de obter uma refeição completa de sangue, induzindo-o a realizar vários repastos sanguíneos para estar totalmente ingurgitado. Alguns estudos indicam que os mosquitos não

infectados completam seu repasto 1,3 vezes mais rápido do que os infectados (YAN *et al.*, 2018).

Os testes de detecção de fontes alimentares mais utilizados são o teste de preceptina e o teste imunoenzimáticos (ELISA). O primeiro consiste na detecção de antígenos solúveis e anticorpos, através da formação de imunocomplexos realizado através de duas metodologias distintas que incluem o teste do capilar e o teste em ágar-gel, sendo este último mais utilizado por utilizar menos reagentes e ser de fácil execução (LAPORTA, 2007). Este método de detecção de fonte alimentar tem baixo custo de implantação, fácil execução, boa reprodutibilidade, diagnóstico rápido, boa sensibilidade e especificidade. Por outro lado, temos o método imunoenzimático ELISA, que possui alto custo de implantação, é rápido, tem boa reprodutibilidade, e permite a titulação das amostras avaliadas. Quanto aos reagentes, possui maior custo, mas tem maior sensibilidade quando comparado ao método da preceptina, além de necessitar de baixo volume de amostra e permitir a identificação de mais de um hospedeiro. No entanto, a ocorrência de reações cruzadas pode dificultar o diagnóstico (LAPORTA 2007).

O avanço das técnicas moleculares mais sensíveis tornou possível a detecção de nanopartículas de DNA necessitando de volumes incomparavelmente baixos quando comparado às técnicas disponíveis. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma técnica para a detecção de múltiplos hospedeiros vertebrados, utilizados como possíveis fontes de repasto para mosquitos do gênero *Culex*, com a detecção de fragmentos de materiais genéticos, sem a interferência de reações cruzadas no diagnóstico, como ocorre em testes imunoenzimáticos. Portanto, foi desenvolvido um diagnóstico sensível, específico e rápido, auxiliando a elucidação precisa em futuros estudos de dinâmica e transmissão de patógenos através das predileções alimentares dos vetores, permitindo assim a elaboração de metodologias de prevenção e controle de vetores e doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras controles de fonte alimentar

O DNA de seis espécies de animais vertebrados foi extraído para servirem como controles positivos de possíveis fontes alimentadas das fêmeas de *Culex* spp., obtidas de amostras controles de sangue total do estoque do Laboratório de Sanidade Avícola da UFRRJ. As espécies testadas como fonte alimentar foram: Bovinos (*Bos taurus*), equino (*Equus caballus*), galinha (*Gallus gallus*), gato (*Felis catus*), cão (*Canis familiares*) e humano (*Homo sapiens*). O DNA padrão de cada controle foi extraído com o kit DNA blood and Tissue, (Invitrogen®). Todos foram quantificados através de espectrofotometria (Nanodrop®) e, subsequentemente, diluídos e aliqüotados em uma concentração de 10 ng/μL.

2.2. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para detecção da fonte alimentar

Foram desenhados dois pares de oligoiniciadores para o diagnóstico por PCR em tempo real (qPCR) para cada uma das seis espécies animais distintos que possivelmente funcionam como fontes alimentares para os dípteros, totalizando 12 pares de oligoiniciadores. Os iniciadores foram desenhados usando o *software* Primer Express 3.0 baseado em sequências de genes alvo de: *Equus caballus* (ID:100053948); *Canis familiares* (ID477032); *Felis catus* (ID100750220); *Gallus gallus* (ID 415407) *Bos taurus* (ID282659) e *Homo sapiens* (ID7157A) Todos disponíveis do Genbank. Especificidade foi testada inicialmente através da ferramenta primer BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-/index.cgi?LINK_LOC = BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

Tabela 4. Oligoiniciadores das espécies contidas no multiplex.

Espécie	Senso	Anti-senso	Pb	TM
<i>C. familiares</i>	CCGGATCCAACAACCCTCA	GGGTTTGCAGGGGTGTAGTT	175	~77,6°C
<i>E. caballus</i>	CCCTAATCCTCTCCATCC	TTGTTTTTCGATGGTGCTTG	247	~81,0°C
<i>F. catus</i>	CGTAATCACTAACCTCCT	GGAAGAATGAAGTGGAAG	126	~78,3°C
<i>G. gallus</i>	GGGACACCCTCCCCCTTAATGACA	GGAGGGCTGGAAGAAGGAGTG	266	~79,5°C
<i>Bos Taurus</i>	AATCCCCCTACTACACAC	GAGGAGAAAGTATAGGACAGA	175	~80,2°C
<i>H. sapiens</i>	AACTTCGGCTCACTCCTTGG	CCCGATGTGTAGGAAGAGGC	204	~82,5°C

2.3. Limite de detecção de DNA dos controles de fonte alimentar

Após a extração, quantificação e padronização das alíquotas de cada controle de fonte alimentar para 10ng/μl, os controles foram diluídos de acordo com o tamanho do genoma de cada espécie a fim de se obter 10⁴ cópias gênicas para cada espécie no ponto inicial seguindo de 5 (cinco) diluições seriadas. Todas as diluições foram testadas para todas as espécies envolvidas na padronização do multiplex qPCR. As reações de qPCR foram realizadas com os pares de oligoiniciadores listados na tabela 4 e as condições de termociclagem foram de 95°C por 15 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos durante 40 ciclos. Os produtos de DNA amplificados pela PCR foram aplicados em gel de agarose 2,5% em tampão TBE 1x. Um volume de 12 μL dos produtos de PCR homogeneizados em 2,0 μl de tampão de corrida foram aplicados no gel. O marcador de massa molecular utilizado foi o DNA Ladder 100pb (Invitrogen). Os produtos também foram submetidos a corrida de eletroforese foram conduzidas em cuba a 75V, durante 50 minutos. Após as corridas, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio e os produtos visualizados em transiluminador de UV.

2.4. Gradiente de temperatura de anelamento dos oligoiniciadores

A última diluição, na qual foi possível a visualização da amplificação em gel de agarose, foi submetida a uma nova PCR para verificação da melhor temperatura de anelamento dos oligoiniciadores de cada espécie, nas quais foram testadas a influência de 6 temperaturas diferentes seriadas no alinhamento dos oligoiniciadores de cada alvo, para a futura montagem da qPCR multiplex. As temperaturas testadas foram de: 55°C a 60°C, utilizando 0,2 mM de cada oligoiniciador.

2.5. Padronização dos ensaios de PCR em tempo real seguido de análise de alta resolução (HRM)

Foram realizados diversos testes de combinações de oligonucleotídeos espécie-específicos, onde de 3 em 3 espécies aleatórias foram testadas em todos os rearranjos possíveis, a fim de saber a interferência dos oligoiniciadores entre si, primeiramente estabelecido de acordo com as temperaturas de dissociação utilizando o software UMelt (disponível em <http://dna.utah.edu/umelt/umelt.htm>). Assim sendo foi estabelecida a melhor combinação entre 3 espécies na multiplex qPCR, de forma que não houvesse redução na sensibilidade da técnica e nem inibição na amplificação dos três alvos. Essas combinações

foram previamente testadas antes da padronização e validação do ensaio de *High Resolution Melt* (HRM).

2.6. Otimização da concentração de oligoiniciadores iniciadores para cada fonte alimentar

A partir da determinação do limite de detecção de DNA da amostra padrão de cada controle foi realizada a otimização das concentrações de oligoiniciadores para cada multiplex. As concentrações avaliadas foram: 200nM, 400nM e 600nM para todas as espécies testadas no multiplex, totalizando 27 combinações diferentes de 3 concentrações distintas para cada espécie de cada triplex. A concentração ótima dos oligoiniciadores iniciadores serão as concentrações mínimas que obtiverem o menor C_q (Ciclo de Quantificação) e o máximo ΔR_n (Reporter normalizado).

2.7. Validação dos ensaios triplex qPCR com *High Resolution Melt*

Após a padronização das espécies que serão detectadas em cada multiplex, assim como a concentração ideal de cada oligoiniciador, subdividiu-se o multiplex em dois triplex: o primeiro contendo as espécies canina, humana e galináceos (Triplex 1); e a segunda contendo felinos, bovinos e equinos (Triplex 2). As reações do ensaio de qPCR HRM para o primeiro triplex foram 1x tampão Meltdoctor®, 4Mm de oligoiniciadores desenvolvidos com alvo de caninos, 4mM de oligoiniciadores em humanos e 6mM de oligoiniciadores com alvo de galináceos. As condições de termociclagem foram 95°C por 10 minutos, 95°C 15 segundos, 57°C 30 segundos, 72°C 30 segundos durante 40 ciclos, 72°C ° 10 minutos. Para o segundo triplex foram utilizados 1x tampão Meltdoctor®, 6Mm oligoiniciadores de felinos, 6mM oligoiniciadores de bovinos e 6mM oligoiniciadores de equinos. Todos os oligoiniciadores foram desenhados para o alvo citocromo b de cada espécie. As condições de termociclagem foram 95°C por 10 minutos, durante 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os volumes finais de ambas as reações foram de 12µl. Foram utilizados 30ng de DNA genômico na reação. Foram utilizados dois machos para controle negativo de fonte alimentar em cada reação.

2.8. Análise Estatística

Foi avaliado a chance de um espécime de mosquito do gênero *Culex* estar alimentado por uma determinada espécie de vertebrado em determinada área ambiental (rural e urbana). Dessa forma foi realizada a meta-análise de efeito fixo de Odds Ratio, no *software* Biostat 5.0, onde utilizamos dois grupos: o grupo1 seria referente as amostras de áreas rurais e o

grupo 2 amostras de áreas urbanas; quando o $OR < 1$, o grupo 2 possui mais probabilidade de possuir a alimentação por determinada espécie; quando a $OR = 1$, os dois grupos possuem a mesma chance de possuir dípteros alimentados por determinada espécie, ou ainda $OR > 1$, o grupo 1 possuirá mais chances quando comparado ao grupo 2, onde mosquitos considerados positivos para o DNA do vertebrado foram denominado como ‘sucesso’ e os negativos para essa mesma espécie considerados ‘insucessos’.

Também foi avaliado o índice de Shannon que mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor a diversidade da amostra. Logo quanto menor o índice de Shannon menor a probabilidade do díptero se alimentar desta espécie. Este índice ecológico foi calculado utilizando o *software* PAST 3.17.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 92% dos mosquitos alimentados com sangue de galináceos 74,27% encontravam-se positivos para *Plasmodium* spp. As espécies de mosquitos alimentadas principalmente de aves estão mais expostas à infecção por espécies de plasmódios aviários.

3.1. Teste de gradiente de temperatura de anelamento dos oligoiniciadores

O teste de gradiente de temperatura do anelamento do oligoiniciadores foi realizado apenas com 1 par de oligoiniciadores específicos para cada espécie e seu alvo padrão individualmente. Na Figura 9 podemos visualizar que todos os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos utilizados amplificaram satisfatoriamente o fragmento de DNA alvo até a temperatura de 60 °C. A temperatura ótima considera foi a penúltima amplificação de cada espécie. Quanto ao triplex 1 (canino, humano e galináceos) (Figura 9), a temperatura de anelamento escolhida foi de 57°C, pois nesta temperatura a intensidade de amplificação da banda das espécies humana e canina, testadas em separado, foi maior. Além disso, quando testadas juntas com temperaturas superiores a esta (57°C), a reação apresentou indicativos de dimerização entre os pares de oligoiniciadores.

Paralelamente foi realizado o teste de gradiente de temperatura de anelamento também para os pares de oligoiniciadores do triplex 2 (felinos, bovinos e equinos) (Figura 10). Observou-se que a temperatura é um fator limitante para amplificação do fragmento alvo na espécie bovina, onde não houve amplificação de produto à 60°C e houve baixa intensidade de amplificação na temperatura de 59°C. Isso também foi observado para a espécie felina, onde a temperatura de 60 °C foi limitante para a amplificação do produto (Tabela 5). Devido aos fatores expostos foi selecionada para este multiplex, a temperatura de 58°C, que permitiu o anelamento de todos os pares de oligoiniciadores sem formação de produtos inespecíficos e/ou dimerização oligoiniciadores.



Figura 9. Gradiente de temperatura oligoiniciadores Triplex 1, em que H (humano), G (galináceos) e C (canídeos). 1 (55°C) 2 (56°C) 3 (57°C) 4 (58°C) 5 (59°C) 6 (60°C) em gel de agarose a 2,5 % corado com Brometo de etídio.

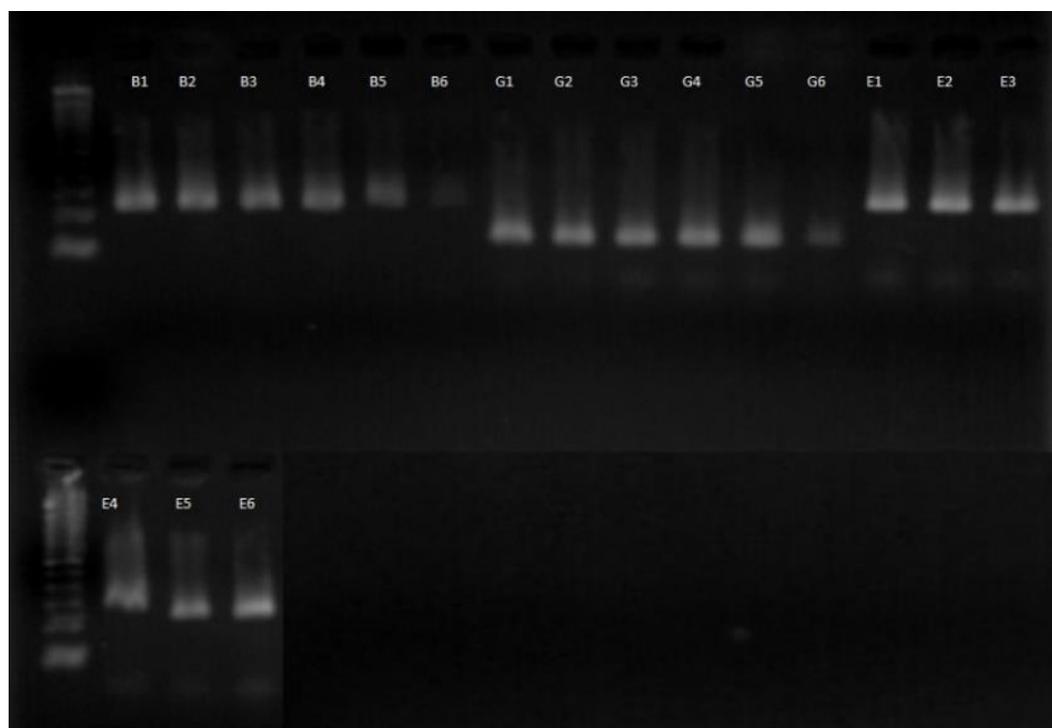


Figura 10. Gradiente de temperatura oligoiniciadores Triplex 2, onde B (bovino), G (galináceos) e C (canídeos). 1 (55°C) 2(56°C) 3(57°C) 4(58°C) 5 (59°C) 6 (60°C) em Gel de agarose a 2,5% corado com Brometo de etídio.

Tabela 5. Melhores temperaturas de anelamento dos oligoiniciadores

Espécie	Última temperatura de amplificação	Temperatura ótima
Bovino	59°C	< 58°C
Equino	60°C	<60°C
Felinos	60°C	<59°C
Canídeos	60°C	<57°C
Humanos	59°C	<59°C
Galináceos	60°C	<59°C

3.2. Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores para cada fonte alimentar

Além da diferenciação através da temperatura de dissociação distintas, é possível fazer a diferenciação de espécies neste ensaio qPCR multiplex através do tamanho do produto amplificado, uma vez que as espécies foram organizadas a fim de possibilitar a diferenciação em qPCR através da avaliação da temperatura de dissociação e/ou através do PCR convencional separando o tamanho dos fragmentos gerados através da visualização em gel de agarose.

Nas figuras 11 e 12 observa-se à amplificação dos 3 alvos com suas respectivas TMs, possibilitando a identificação de cada fonte alimentar. A intensidade da curva gerada de cada alvo testado dentro do multiplex também pode ser um indicador da intensidade do alvo da alimentação e tempo de ingestão do sangue de cada hospedeiro vertebrado avaliado.

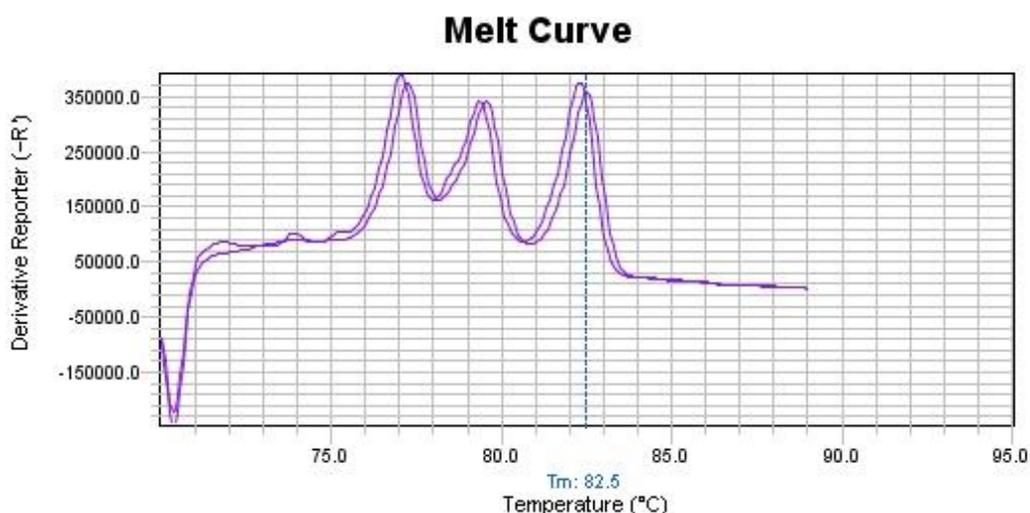


Figura 11. Curvas de dissociação demonstrando a tripla amplificação e diferentes temperaturas no Triplex 1, utilizando os controles padrão de cada espécie com a concentração de oligoiniciadores padronizada.

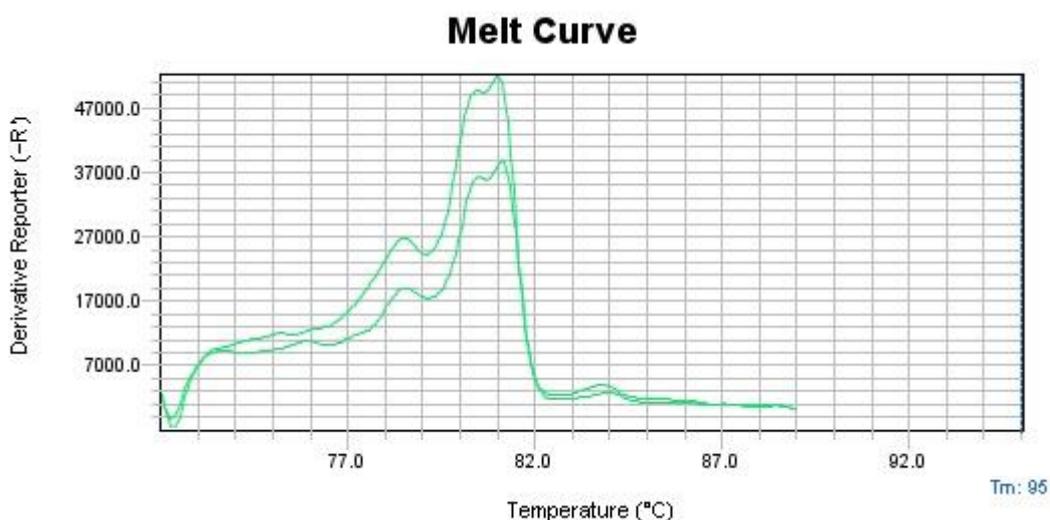


Figura 12. Curvas de dissociação demonstrando a tripla amplificação e diferentes temperaturas no Triples 2, utilizando os controles padrão de cada espécie com a concentração de oligoiniciadores padronizada.

3.3. Limite de detecção da qPCR HRM para cada alvo testado.

O limite de detecção de qPCR para o *Cyt b* com alvos em equino, bovino e felino foi de 1 cópias de DNA genômico contendo o produto amplificado para cada alvo. O coeficiente de correlação das cinco diluições testadas na curva padrão foi de 98,4% para felino (Figura 13), com C_q variando de 20,34 na primeira diluição (10^4 cópias de DNA genômico) a 33,43 na última diluição (1 cópia de DNA genômico). As curvas tiveram o mesmo desempenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 99,92%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos.

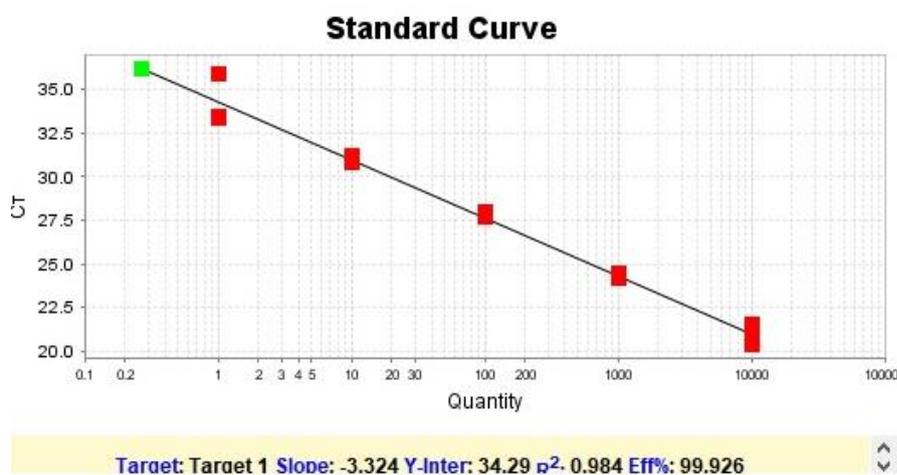


Figura 13. Curva padrão para o triples 2 com alvo na espécie *Felis catus*.

O coeficiente de correlação das cinco diluições testadas na curva padrão foi para bovino de 98,9%, com Cq variando de 18,92 para X número de cópias na primeira diluição e a 32,75 para Y número de cópias na última diluição (Figura 14). As curvas tiveram o mesmo desempenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 99,18%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos.

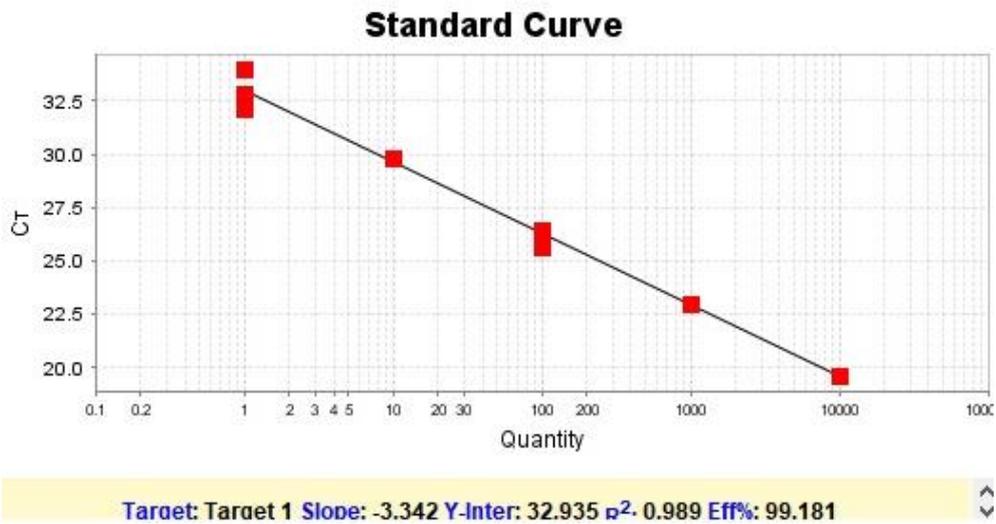


Figura 14. Curva padrão para o triplex 2 com alvo na espécie *Bos Taurus*.

O coeficiente de correlação das cinco diluições testadas na curva padrão foi para equino foi de 99,6% , com Cq variando de 20,2 para X número de cópias na primeira diluição e a 36,96 para Y número de cópias na última diluição (Figura 15). As curvas tiveram o mesmo desempenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 97,68%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos.

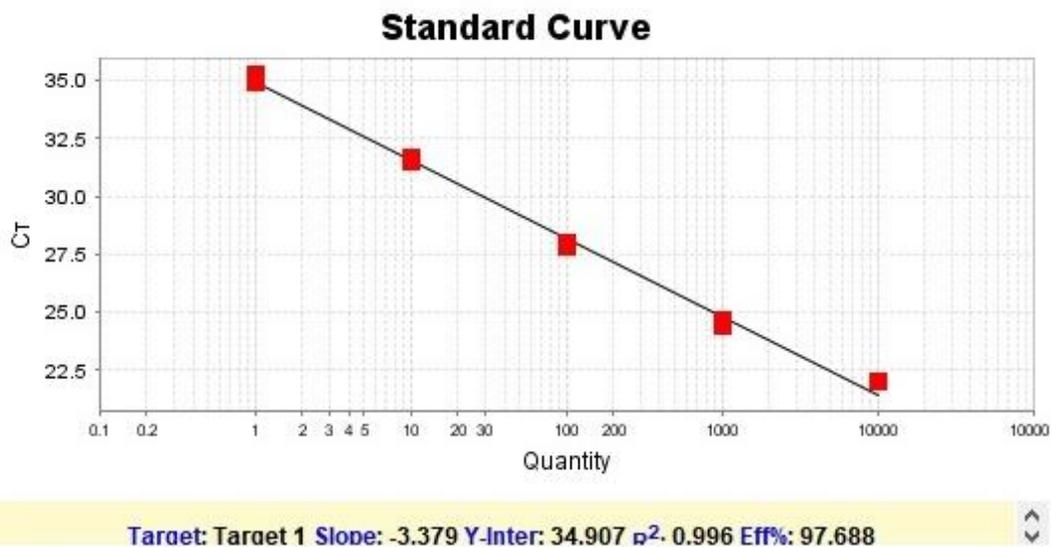


Figura 15. Curva padrão para o triplex 2 com alvo na espécie *Equus caballus*.

O limite de detecção de qPCR para o Cyt b com alvos em cães, humanos e galináceos foi de 1 cópias de DNA genômico contendo o produto amplificado para cada alvo. O coeficiente de correlação das cinco diluições testadas na curva padrão foi para humano de 99,6%, com Cq variando de 18,14 na primeira diluição (10^4 cópias de DNA genômico) a 32,08 na última diluição (1 cópia de DNA genômico) (Figura 16). As curvas tiveram o mesmo desempenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 97,96%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos.

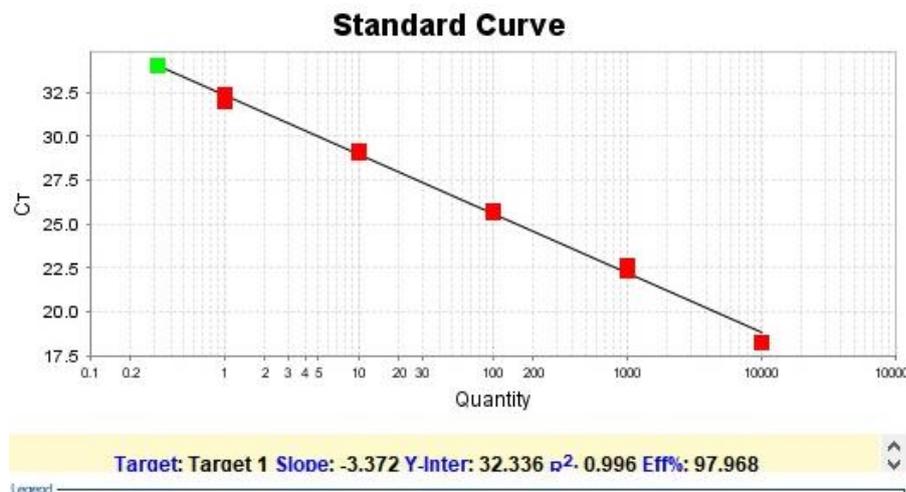


Figura 16. Curva padrão para o triplex 1 com alvo na espécie *Homo sapiens*.

O coeficiente de correlação das cinco diluições testadas na curva padrão foi para cães foi de 99,4%, com Cq variando de 19,25 para X número de cópias na primeira diluição e a 32,71 para Y número de cópias na última diluição (Figura 17). As curvas tiveram o mesmo desempenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 100,6%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos.

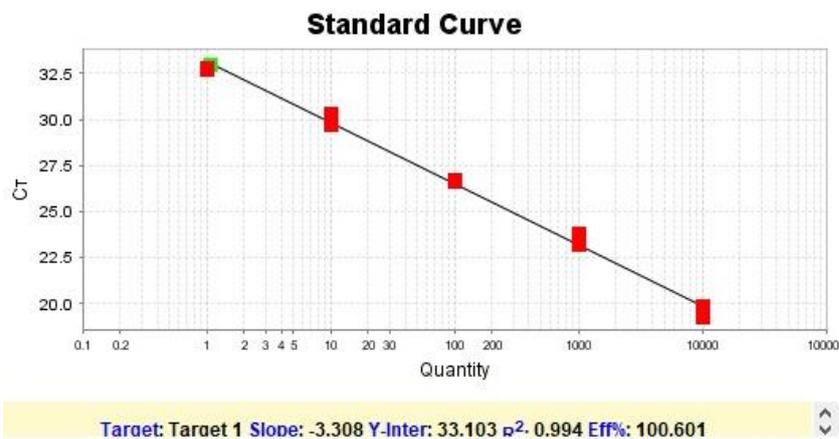


Figura 17. Curva padrão para o triplex 1 com alvo na espécie *Canis familiares*.

O coeficiente de correlação das cinco diluições testadas na curva padrão foi para galináceos foi de 99%, com Cq variando de 18,92 para X número de cópias na primeira diluição e a 31,92 para Y número de cópias na última diluição (Figura 18). As curvas tiveram o mesmo desempenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 97,64%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos.

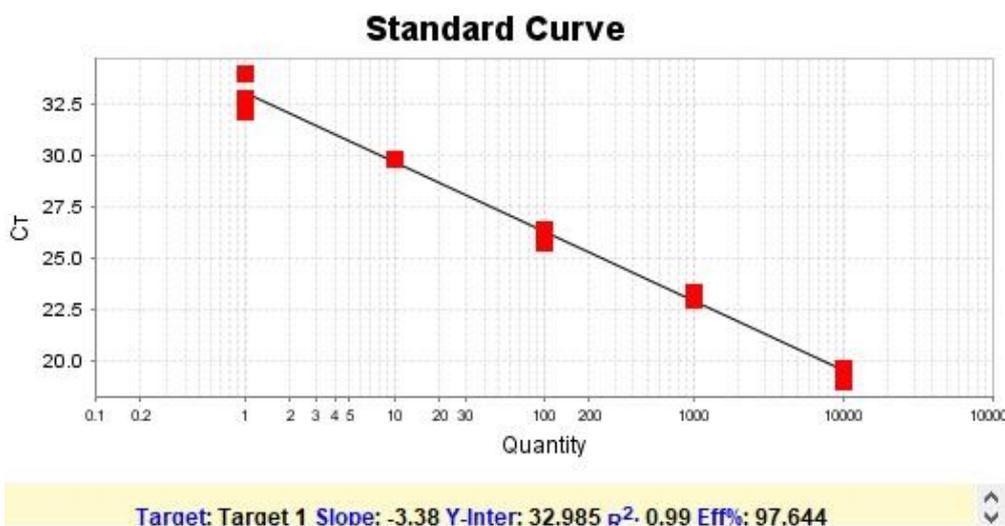


Figura 18. Curva padrão para o triplex 1 com alvo na espécie *Gallus gallus*.

3.4. Validação de dois ensaios de PCR em tempo real utilizando *High Resolution Melt*

A identificação da fonte alimentar das fêmeas ingurgitadas foi realizada através dos ensaios qPCR HRM triplex padronizados. Neste estudo foram coletadas um total de 611 fêmeas ingurgitadas identificadas como sendo do gênero *Culex*. Destes espécimes coletados foram selecionadas 300 fêmeas para avaliação molecular.

Para o qPCR triplex 1, obtivemos os seguintes achados: resultado positivo para canídeos e humanos simultaneamente foram 2,34% do total de espécimes; positivos para canídeos e galináceos foram 0,67% do total testado e positivos para galináceos e humanos foram 31,66% das amostras. Mosquitos que se apresentaram positivos para os 3 materiais genéticos testados neste triplex lideraram as taxas de co-alimentação com 37% (Figura 19).

Os dados observados neste triplex 1 corroboram com Forattini (2002) que obtiveram resultados semelhantes para os gêneros *Culex*, principalmente *C. quinquefasciatus*, ao demonstrarem a predileção alimentar desta espécie por aves, humanos e, por último, por cães. Este fato pode ser atribuído a uma das características deste gênero de mosquito, a antropofilia, e, por conseguinte, a predileção alimentar por animais domesticados pelo homem como cães e aves, que vivem nos peridomicílios. No caso dos cães, a convivência estreita com os humanos

pode favorecer o repasto nestes grupos de animais (MARTINEZ DE LA PUENTE, 2016) diante da ausência da fonte alimentar de predileção (humano e aves). Desta forma, o repasto realizado em canídeos justifica-se pela característica oportunista do vetor (GOMES *et al.*, 2003; LAPORTA, 2007), uma particularidade de algumas espécies do gênero *Culex*.

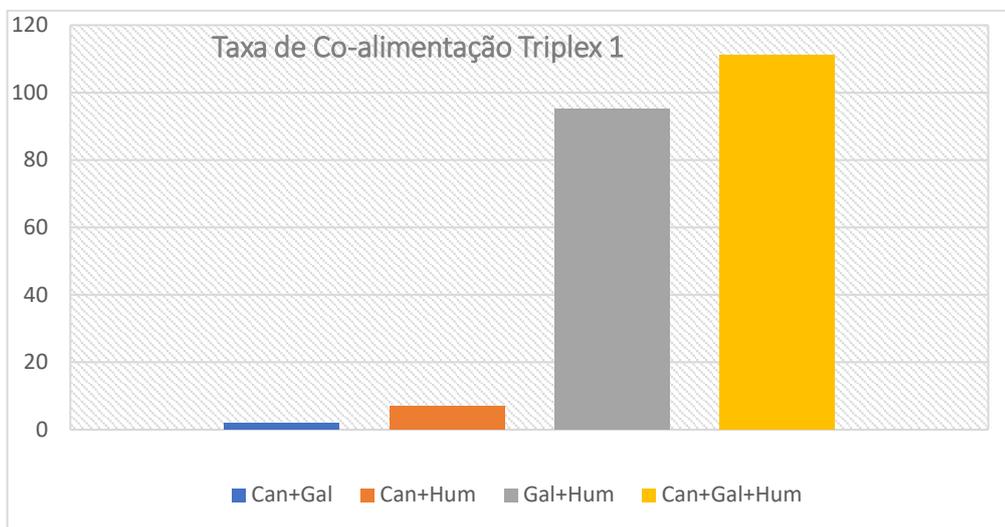


Figura 19. Taxa de Co-alimentação do Triplex 1.

As taxas de co-alimentação para o triplex 2 foram as seguintes: positividade na qPCR para felinos e equinos em um total de 2% de espécimes testados; para felinos e bovinos 3%, bovinos e equinos 21% e tripla alimentação em apenas 2% das amostras testadas (Figura 20).

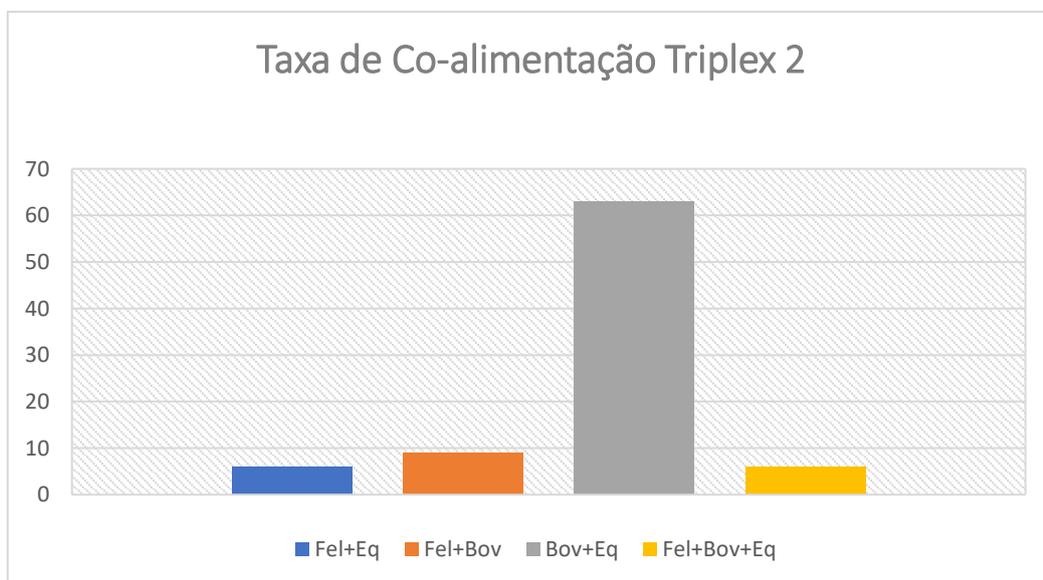


Figura 20. Taxa de Co-alimentação do triplex 2.

Paralelamente foi avaliada a taxa alimentar dos mosquitos para cada espécie animal testada como fonte alimentar. Os resultados obtidos desta avaliação foi uma maior prevalência de mosquitos alimentados com sangue de galináceos, abrangendo 92% dos mosquitos

avaliados, ratificando sua preferência ornitófila; seguido por 72%, alimentados com sangue de humanos; 66,33% positivos para DNA de bovinos; 40,33% alimentados em canídeos; 28,33% alimentados em equinos e, por fim, 9,3% dos mosquitos avaliados positivos para felinos.

Também foi avaliado a chance de um espécime de mosquito do gênero *Culex* estar alimentado por uma determinada espécie de vertebrado em determinada área ambiental (rural e urbana). Foi realizada a meta-análise de efeito fixo de Odds Ratio, no *software* Biostat 5.0, onde utilizamos dois grupos, onde o grupo 1 seria referente as amostras de áreas rurais e o grupo 2 amostras de áreas urbanas. Desta forma conseguimos calcular a chance de um mosquito estar alimentado por determinada espécie entre os grupos 1 (áreas rurais) e grupo 2 (áreas urbanas) e outro. Para isso observamos a ocorrência de positividade nas duas áreas para as 6 espécies testadas, assim observamos os valores nas tabelas de contingência a seguir de acordo com cada espécie em questão e relacionando com a zona referente (Figura 21).

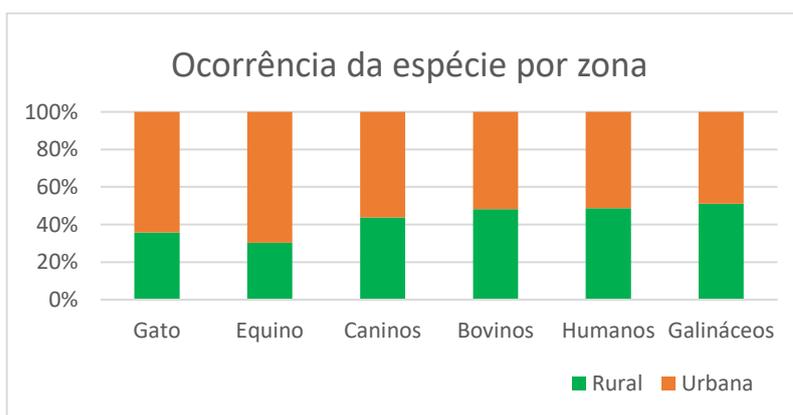


Figura 21. Frequência de positividade das fêmeas de *Culex* sp. com relação à espécie animal de fonte alimentar de acordo com a zona ambiental de captura.

O grupo 2 (Tabela 6), que representa os espécimes alimentados por gatos nas áreas urbanas não apresentou diferença significativa em relação aos espécimes alimentados com sangue de gatos em áreas rurais (p valor=0,2011 e OR= 0,54).

Tabela 6. Tabela de contingência de fêmeas de *Culex* sp. alimentadas capturadas em duas áreas distintas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de gatos.

	Sucesso	Insucesso	Total
Rural	10	137	147
Urbano	18	135	153
Total	28	272	300

O grupo 2 (Tabela 7), que representa os espécimes alimentados por equino nas áreas urbanas apresentou diferença significativa em relação aos espécimes alimentados com sangue de equino em áreas rurais (p valor $< 0,0001$ e $OR= 0,2691$) evidenciando que a área 2 possui mais chances de apresentar espécimes alimentados por sangue de equino do que a área 1.

Tabela 7. Tabela de contingência de fêmeas de *Culex* sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de equino.

	Sucesso	Insucesso	Total
Rural	37	110	147
Urbano	85	68	153
Total	122	178	300

O grupo 2 (Tabela 8), que representa os espécimes alimentados por bovino nas áreas urbanas não apresentou diferença significativa em relação aos espécimes alimentados com sangue de bovino em áreas rurais (p valor= $0,8050$ e $OR= 0,91$) evidenciando que a área 1 e 2 possuem quase equivalência na frequência alimentar de dípteros com sangue de bovino.

Tabela 8. Tabela de contingência de fêmeas de *Culex* sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de bovino.

	Sucesso	Insucesso	Total
Rural	96	51	147
Urbano	103	50	153
Total	199	101	300

O grupo 2 (Tabela 9), que representa os espécimes alimentados por cão nas áreas urbana não apresentou diferença significativa em relação aos espécimes alimentados com sangue de cão em áreas rurais (p valor $0,1798$ e $OR= 0,70$).

Tabela 9. Tabela de contingência de fêmeas de *Culex* sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de cão.

	Sucesso	Insucesso	Total
Rural	53	94	147
Urbano	68	85	153
Total	121	179	300

O grupo 2 (Figura 10), que representa os espécimes alimentados por humanos nas áreas urbanas não apresentou diferença significativa em relação aos espécimes alimentados com sangue de humanos em áreas urbanas (p valor=0,9303 e OR= 0,94) evidenciando que a área 2 e 1 possuem quase equivalência em apresentar espécimes alimentados por sangue de humanos (OR=1).

Tabela 10. Tabela de contingência de fêmeas de *Culex* sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de humano.

	Sucesso	Insucesso	Total
Rural	105	42	147
Urbano	111	42	153
Total	216	84	300

O grupo 1 (Figura 11), que representa os espécimes alimentados por galinha nas áreas rurais apresentou diferença significativa em relação aos espécimes alimentados com sangue de galinha em áreas urbanas (p valor < 0,0001) e OR= 8,89 evidenciando que a área 1 possui 8,89 vezes mais chances de apresentar espécimes alimentados por sangue de galinhas do que a área 2. Isso indica uma preferência alimentar por aves (GOODMAN, 2018).

Tabela 11. Tabela de contingência de fêmeas de *Culex* sp. alimentadas de duas áreas (rural e urbana). Chance destes espécimes estarem alimentados por sangue de galinha.

	Sucesso	Insucesso	Total
Rural	141	6	147
Urbano	111	42	153
Total	252	48	300

Quanto as características ambientais, podemos concluir que não foram encontradas diferenças significativas na ocorrência do repasto em diferentes espécies quando comparando-se os tipos de ambiente. A espécie animal identificada no mosquito que apresentou diferença significativa quando relacionada ao tipo de área foi o equino, que apresentou uma frequência maior como fonte alimentar no ambiente urbano quando comparado ao rural. Já no ambiente rural quem apresentou significância estatística na frequência do repasto sanguíneo do mosquito, chegando ser de até 8 vezes maior quando comparada ao ambiente urbano foram os galináceos; quanto as demais espécies testadas foram semelhantes para as duas zonas estudadas, não apresentando significância estatística entre elas.

As preferências alimentares citadas acima podem ter sido influenciadas pela disponibilidade e pela facilidade de acesso a estas fontes alimentares, caracterizando o comportamento oportunista dos vetores. Porém podemos inferir que as mudanças comportamentais na atividade e prevalência de culicídeos decorrentes dos processos de antropofilização e o desmatamento teria beneficiado a ocorrência e aumentado sua densidade, o que comprova a resposta adaptativa do vetor na área urbana (FORATTINI, 2002). Além disso os relevos e características das paisagens urbanas são variáveis e dependendo do nível de negligência do local, a formação de reservatórios não fiscalizados também podem beneficiar o crescimento da densidade vetorial de determinadas espécies nas áreas urbanas (GOODMAN, 2018).

O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido. Quanto menor o índice de Shannon menor a probabilidade do díptero se alimentar desta espécie. A tabela abaixo indica os valores encontrados para o índice, em que a espécie com menos probabilidade de ser escolhida pelo mosquito sendo o gato com $H=0,6518$ e a espécie com maior frequência de alimentação do díptero sendo a galinha com $H=0,6929$ seguida do humano com $H = 0,6829$.

Tabela 12. Correlação das espécies testadas no estudo como fonte de repasto e os valores encontrados no índice de Shannon.

Espécie	Shanon- h
<i>Felis catus</i>	0,6518
<i>Equus caballus</i>	0,6136
<i>Canis familiares</i>	0,6854
<i>Bos taurus</i>	0,6925
<i>Homo sapiens</i>	0,6928
<i>Gallus gallus</i>	0,6929

Os resultados obtidos no que remete a fonte alimentar de culicídeos confirmam o potencial ornitofílico dos mosquitos do gênero *Culex* (REJON, GOODMAN, 2018) diante as outras espécies testadas (MOLAEI, 2007; BOHG, 2001; FORATTINI, 2002; DEMARI E SILVA, 2009), seguida de sua preferência em se alimentar em humanos (GOMES 2003; ZINSER, 2004).

A maior ocorrência de repasto sanguíneo em aves por parte das espécies *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* confirma os resultados obtidos por Molaei *et al.* (2007)

seguido pelos achados de alimentação realizada em mamíferos, que por limitações de sua técnica não houve a possibilidade de diferenciá-los em gênero como ocorreu neste estudo. Evidenciando assim a importância da criação de ferramentas moleculares mais sensíveis capazes de diferenciar essa Ordem e elucidar melhor as preferências alimentar do gênero *Culex*. Outros estudos indicam característica oportunista destes vetores considerando que seu hábito alimentar está relacionado com a facilidade de acesso ao hospedeiro vertebrado (GOMES, 2003; ZINSER, 2004; DEMARI *et al.*, 2009). Estes autores encontraram em seus estudos resultados divergentes a este executado, demonstrando uma predileção alimentar de *Cx. quinquefasciatus* por mamíferos. Este fato deve-se ao tipo de técnica utilizada para detecção da fonte de repasto sanguíneo, sendo a utilizada por Gomes *et al.* o método de preceptina, que não permite a diferenciação de muitas espécies simultaneamente. Além disso, em seus estudos não foram diferenciados os mamíferos pelos quais o vetor estaria se alimentando. Zinser *et al.* (2004), utilizaram o método de diagnóstico ELISA, ao encontrar maior prevalência alimentar de *Cx. quinquefasciatus* com sangue de humano e aves, sugerindo que existe diversidade regional considerável em relação às espécies escolhidas para as refeições de sangue por parte do díptero, evidenciando o caráter oportunista da espécie.

Sabe-se que o comportamento alimentar pode ser influenciado pela ocorrência de infecção pelo parasita da malária aviária. A taxa de positividade dos mosquitos encontrada neste estudo foi de 74,24% (Figura 22). Este resultado pode ser um fator decisivo para a escolha das fontes de repasto sanguíneo pelos mosquitos em aves, justificando assim a maior ocorrência desta espécie nos dípteros avaliados. Esta estratégia do protozoário tem como objetivo perpetuar o ciclo biológico do parasito através dos mecanismos já citados neste estudo, como demonstrado por Cornet *et al.* (2013), que evidenciaram maior taxa de alimentação de mosquitos em aves que sofreram infecções experimentais com *Plasmodium* spp., do que em indivíduos não infectados.

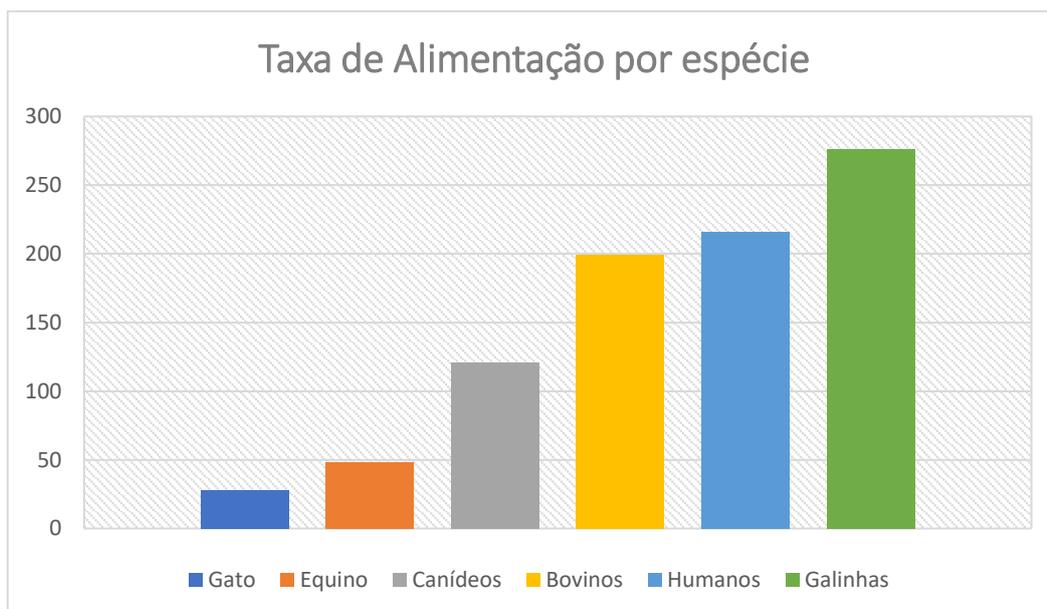


Figura 22. Taxa de alimentação de fêmeas de *Culex* sp. de acordo com espécie de hospedeiros.

O ensaio de qPCR HRM desenvolvido neste estudo possibilitou a identificação de até 3 fontes alimentares diferentes simultaneamente. Além disso, apresenta alta sensibilidade, por resultar em pequenos produtos em suas amplificações. Estes fatores tornam este estudo uma ferramenta de auxílio para obtenção de resultados mais fidedignos permitindo o diagnóstico mesmo em amostras com baixa quantidade de material genético e co-infectadas (REJON, 2018).

As análises de repastos sanguíneos são úteis para elucidar o papel ecológico das espécies de hospedeiros vertebrados no apoio ao crescimento da população de mosquitos e na dinâmica da transmissão de patógenos. Isso possibilita a identificação da composição de espécies hospedeiras de mosquitos em bairros com diferentes condições ambientais, auxiliando na compreensão de como o acesso aos hospedeiros vertebrados varia em toda a paisagem urbana e rural e influencia a variação no potencial de transmissão de agentes patogênicos (GOODMAN, 2018).

Além disso, o conhecimento das preferências hematófagas e elucidação de dinâmicas de transmissão de uma determinada espécie de vetor tornam eficazes as medidas estratégicas na dinâmica epidemiológica no controle de vetores e doenças transmitidas por estes (KOELLA, 2002; SMITH, 2012; REJON 2018).

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de duas técnicas sensíveis e eficazes para a detecção simultânea de até três fontes alimentares abre novas perspectivas para estudos relacionados à interação parasito-vetor, permitindo a consideração das preferências alimentares do vetor. Atualmente, as técnicas descritas na literatura são capazes de distinguir fontes de alimentação apenas por meio da diferenciação do tamanho do produto gerado ou por métodos sorológicos. No entanto, esses métodos podem carecer de sensibilidade adequada em amostras degradadas ou com baixa disponibilidade genética do alvo.

A técnica de qPCR HRM desenvolvida neste estudo apresenta vantagens significativas, pois permite uma avaliação mais rápida e precisa, sendo uma técnica de diagnóstico direto do alvo. Além disso, ela possibilita o diagnóstico de alimentações que envolvem mais de uma fonte de repasto, o que é crucial para compreender a complexidade das interações entre vetores e hospedeiros.

O conhecimento aprofundado sobre o comportamento do vetor, incluindo seus hábitos alimentares, não apenas contribui para o desenvolvimento de estratégias de controle eficazes para vetores e agentes patogênicos, mas também fornece insights valiosos sobre a ecologia e o ciclo de vida desses dípteros. Essa abordagem integrada é essencial para avançar na compreensão e na gestão de doenças transmitidas por vetores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. A., et al. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. **Proc. Roy. Soc. B.**; 266: 1729–1733, 1999.
- AYRES, C. F. J.; ROMÃO, T. P. A.; MELO-SANTOS, M. A. V. Genetic Diversity in Brazilian Populations of *Aedes albopictus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 97(6): 871-875, September 2002.
- BARKER Jr., R. H.; BANCHONGAKSORN, T.; COURVAL, J. M., et al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood sample using the polymerase chain reaction. **Am. J. Trp. Med. Hyg.**, v. 46, p. 416-426, 1992.
- BECKER, N., et al. **Mosquitoes and their control**. 2nd edition. New York: Kluwer Academic Publishers, 2010.
- BELTRÁN, E. Características de uma cepa mexicana (14B) de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. **Revista del Instituto del Salubridad y Enfermedades Tropicales del Mexico**, v. 4, n. 2, p. 265-272, 1943.
- BENNETT, G. F.; WARREN, M. C. W. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. III- Life cycle of the erythrocytic parasite in the avian host. **J Parasitol**; 52: 653- 9. 1966.
- BRAKS, M. A. H.; MEIJERINK, J.; TAKKEN, W. The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and L-lactic acid, in an olfactometer. **Physiological Entomology**, v. 26, p. 142-148, 2001.
- CABRINI, I., & ANDRADE, C. F. S. Resposta de Fêmeas de Mosquitos ao Hospedeiro – busca por Alimentação. Página na Internet: Ecologia Aplicada - Instituto de Biologia da UNICAMP, 2006.
- CAUSEY, O.R. et al. *Anopheles (Nyssorhynchus) sawyeri*, a new anopheline mosquito from Ceará, Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 36, n. 1, p. 11–20, 1943.
- CHEN, T. H., et al. Avian *Plasmodium* infection in field-collected mosquitoes during 2012-2013 in Tarlac, Philippines. **J Vector Ecol, Dec**; 40(2): 386-92, 2015.
- CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes - Sensory Reception and Behavior**, vol. 2, CABI Publishing, 1999.
- COOPER, R. D.; FRANCES, S. P.; POPAT, S.; WATERSON, D. G. E. The effectiveness of light, 1-octen-3-ol, and carbon dioxide as attractants for anopheline mosquitoes in Madang Province, Papua New Guinea. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 20, n. 3, p. 239-242, 2004.
- DANILEWSKY, Brasil. Zur Parasitologie des Blutes. **Biologisches Zentralblatt, Leipzig**, n.5, p. 529-537, 1886.

DEMARI-SILVA, B., et al. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from Barcode identification of *Culex*. the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. **J Med Entomol** 48: 272-279, 2011.

FIGUEIREDO, Thaysa Carolina Cantanhede. A infecção natural por plasmódios em anofelinos na Mata Atlântica-Revisão Bibliográfica. 2021.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica, Vol. II.** Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1965. 506 p.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**, Vol. 2, EDUSP, São Paulo, 864 pp. 2002.

GARNHAN, P. C. C., Malária parasite and other haemospodia. **Oxford. Blackell Scientific.** 1114p, 1866.

GOMES, A. C., et al. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley region, State of Sao Paulo, Brazil. **J Vector Ecol** 28: 74–78, 2003.

GOODMAN, H. Primary blood hosts of mosquitoes are influenced by social and ecological conditions in a complex urban landscape. **Rev parasites and Vectors.** 2018.

GORHAM, J.R.; STOJANOVICH, C.J.; SCOTT, H.G. Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica Oriental. U.S. **Department of Health, Education, and Welfare**, 1967. 64 p.

GUIMARÃES, A. E. Aspectos da ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1998.

HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Syst Entomol**; 23: 327-701998.

HELLGREN, J., WALDENSTROM, AND S. BENSCH. A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. **Journal of Parasitology** 90: 797–802, 2004.

HELLGREN, O., BENSCH, S., MALMQVIST, B. Bird hosts, blood parasites and their vectors - associations uncovered by molecular analyses of black fly blood meals. **Mol Ecol** 17: 1605–1613, 2008.

KNOLS, B. G. J.; MEIJERINK, J. Odors influence mosquito behavior. **Science & Medicine**, v. 4, n. 5, p. 56-63, 1997.

KRETLI, A. U. Plasmodium juxtannucleare in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 14: 235-245, 1972.

KOELLA, J. C. An evolutionary view of the interactions between anopheline mosquitoes and malaria parasites. **Microbes Infect** 1: 303–308. 1999.

KOELLA, J. C., et al. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. **Behav. Ecol.**; 13: 816–820, 2002.

LAPOINTE, D. A., GOFF, M. L., & ATKINSON, C. T. Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawaii to avian malaria, *Plasmodium relictum*. **J Parasitol** 91: 843–849, 2005.

LAPOINTE, J., et al. Ecology and conservation biology of avian malaria. **Ann N Y Acad Sci** 1249: 211–226, 2012.

LAPOINTE, J., et al. Nest-climatic factors affect the abundance of biting flies and their effects on nestling condition. **Acta Oecol** 36: 543–547, 2010.

LAPOINTE, D. A., ATKINSON, C. T., & SAMUEL, M. D. Ecology and conservation biology of avian malaria. **Ann N Y Acad Sci** 1249: 211–226, 2012.

LAPOINTE, J., et al. Effects of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector in An. **Atroparvos. Malaria Journal**. 2013.

LAPOINTE, D. A., ATKINSON, C. T., & SAMUEL, M. D. Ecology and conservation biology of avian malaria. **Ann N Y Acad Sci** 1249: 211–226, 2012.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calábria), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. I-Frequência comparativa das espécies e métodos de coleta. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984; 79: 479-90.

MASSARD, C. L. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidida: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* da raça Leghorn Branca. Arquivos da Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro, 5: 141-146, 1982.

MEIJERINK, J.; VAN LOON, J.J.A. Sensitivities of antennal olfactory neurons of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to carboxylic acids. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p. 365-373, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Francisco Anilton Alves Araújo, Marcelo Santalucia. – 3ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 76 p., 2011.

MOLAEI, G., et al. Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas. **Am J Trop Med Hyg.**; 77: 73, 2007.

MOTA, R. A., et al. Variáveis Hematológicas em *Gallus domesticus*, Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectados com *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941). **Ciênc Vet Trop Recife**; 1: 76-80, 1998.

MUNHOZ, J., et al. Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain. **PLoS One** 7: e39549, 2012.

PARAENSE, W. L. Um inquérito sobre a ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambui (estado de Minas Gerais). Mem Inst Oswaldo Cruz; 47: 361-5; 1949.

PERKINS, S. L.; OSGOOD, S. M.; SCHALL, J. J. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria. Implications for epizootiology. **Mol. Ecol.**, v. 7, p. 1587-1590, 1998.

PUMPUNI, C. B.; KNEPLER, J.; CRAIG, G. B. Jr. Influence of temperature and larval nutrition on the diapause inducing photoperiod of *Aedes albopictus*. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 8, n. 3, p. 223-227, setembro de 1992. PMID: 1402857.

REJON, J. E., et al. Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. 12pp. **Journal of Insect Science** 10:32 available online: insectscience.org/10.32, 2010.

RIBEIRO, S. F., et al. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitol.**, v. 130, p. 261-267, 2005.

SANTOLIN, I. D. Estudo ecológico de carrapatos associados com aves no entorno do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil; seu papel como bioindicadores e/ou agentes patogênicos de risco para saúde silvestre e coletiva. UFRRJ, 2014.

SHIRA, Y., et al. Landing sites on the human body preferred by *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 18, n. 2, p. 97-99.

SMITH, D. L., et al. Ross, MacDonald, and a theory for the dynamics and control of mosquito-transmitted pathogens. **PLoS Path.**; 8: e1002588, 2012.

SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H.; SOUZA, P. C. A. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). **Parasitologia al dia**, v. 23, p. 87-90, 1999.

SOUZA, P. C. A. Malária Aviária: Parasitismo por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos clínicos e patológicos de sua infecção experimental. Tese de Doutorado, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 137p., 1998.

VALKIUNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. CRC Press, Boca Raton, 2005.

VALKIUNAS, S. BENSCH, T. A. IEZHOVA, A. KRIZĀ ANAUSKIENE, O. HELLGREN, BOLSHAKOV, C. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: Microscopy is still essential. **Journal of Parasitology** 92: 418-422, 2006.

VAN RIPER III, C., et al. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. **Ecol. Monogr.**, v. 56, p. 327–344, 1986.

VAN RIPER III, C., et al. Plasmodia of birds. In: Kreier, J. P. (ed.), Parasitic protozoa San Diego, CA: **Academic Press**, p. 73–140, 1994.

YAN, J., et al. Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. 12pp. **Journal of Insect Science** 10:32 available online: insectscience.org/10.32, 2010.

ZINSER, M., et al. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. **J Insect Sci** 4: 20, 2004.

6. ANEXOS

Anexo I Tabela de pontos georreferenciados dos pontos de coleta

Armadilha	Bairro	Zona	Longitude	Latitude
A1	Campo lindo	Urbana	640047	7474650
A2	Campo lindo	Urbana	639782	7474911
A3	Campo lindo	Urbana	639843	7475029
A4	Campo lindo	Urbana	639456	7475204
A5	Campo lindo	Urbana	640091	7475124
A6	Campo lindo	Urbana	640431	7475234
A7	Campo lindo	Urbana	640431	7475360
A8	Campo lindo	Urbana	639973	7474864
A9	Campo lindo	Urbana	639720	7475314
A10	Campo lindo	Urbana	639674	7478218
A11	Valão das louças	Rural	628215	7484534
A12	Valão das louças	Rural	629820	7485076
A13	São Miguel	Rural	630885	7489753
A14	São Miguel	Rural	631045	7489586
A15	São Miguel	Rural	631585	7489750
A16	São Miguel	Rural	632668	7487654
A17	Valão das louças	Rural	627171	7483849
A18	Valão das louças	Rural	628629	7484742
A19	Valão das louças	Rural	627547	7484215
A20	Santa Sofia	Rural	629873	7487840
A21	Santa Sofia	Rural	630289	7487287
A22	Fazenda Caxias	Urbana	632555	7483452

Anexo II. Tabela de coletas totais de dípteros ao longo de um ano diferenciando por forma alimentar, sexo e gênero.

Data	CULEX		CULEX	AEDES		ANOP	
	AL	NA	♂	♀	♂	♀	♂
05/jul/16	17	11	4	1	0	0	0
06/jul/16	19	31	18	0	3	0	0
07/jul/16	3	16	2	0	0	0	0
12/jul/16	9	28	6	2	1	3	0
13/jul/16	1	22	4	0	0	0	0
14/jul/16	0	29	0	2	0	0	0
01/ago/16	15	19	11	0	0	0	0
02/ago/16	11	8	0	0	0	0	0
03/ago/16	8	20	0	0	0	0	0
09/ago/16	1	14	7	0	0	0	0
10/ago/16	3	17	7	0	0	0	0
11/ago/16	7	7	4	0	0	0	1
13/set/16	3	3	7	0	0	1	8
14/set/16	12	7	4	0	0	0	0
15/set/16	9	4	1	0	0	0	0
27/set/16	7	47	4	0	1	1	0
28/set/16	3	27	5	0	0	0	0
29/set/16	15	14	7	1	0	0	0
18/out/16	7	17	0	1	0	2	0
19/out/16	10	4	3	0	1	0	0
20/out/16	13	1	1	0	0	0	0
25/out/16	14	19	6	0	0	1	0
26/out/16	6	10	3	2	0	0	0
27/out/16	6	1	4	0	0	0	0
22/nov/16	15	16	17	1	0	0	0
23/nov/16	5	22	1	0	1	0	0
24/nov/16	6	8	2	0	0	0	0
28/nov/16	11	38	23	7	0	1	0
29/nov/16	7	12	14	0	0	0	0
30/nov/16	7	24	23	1	0	0	0
05/dez/16	27	48	11	3	0	0	0
06/dez/16	8	39	8	0	0	0	0
07/dez/16	6	15	2	0	0	0	0
12/dez/16	30	69	25	1	1	1	0
13/dez/16	7	44	13	0	0	0	0
14/dez/16	7	13	13	0	0	0	0
17/jan/17	7	31	36	5	0	0	1
18/jan/17	7	10	7	0	0	0	0
19/jan/17	7	15	2	2	0	1	0

24/jan/17	9	44	13	3	0	0	0
25/jan/17	10	40	7	2	1	1	0
26/jan/17	2	36	3	1	1	0	0
31/jan/17	9	30	14	2	0	0	0
01/fev/17	5	14	3	1	0	1	0
02/fev/17	3	15	3	0	0	0	0
07/fev/17	6	36	1	0	0	0	0
08/fev/17	3	14	7	0	1	0	0
09/fev/17	1	7	2	0	0	0	0
14/mar/17	3	3	7	0	0	0	2
15/mar/17	7	2	4	0	0	0	0
16/mar/17	0	3	4	1	0	0	0
21/mar/17	13	48	13	5	0	0	0
22/mar/17	9	41	11	4	0	3	0
23/mar/17	3	43	4	1	1	0	0
04/abr/17	3	12	1	0	0	0	2
05/abr/17	10	7	11	2	0	0	0
06/abr/17	7	10	5	0	0	0	0
26/abr/17	8	53	23	1	1	0	0
27/abr/17	13	37	3	2	0	0	0
28/abr/17	0	11	6	0	0	0	0
09/mai/17	20	20	19	1	0	1	0
10/mai/17	13	14	10	0	0	1	0
11/mai/17	24	33	13	0	0	0	0
23/mai/17	0	38	6	0	0	0	0
24/mai/17	6	36	3	0	0	0	0
25/mai/17	4	20	1	0	0	0	0
05/jun/17	8	13	12	1	0	1	1
06/jun/17	23	13	33	1	0	0	1
07/jun/17	10	6	6	0	0	1	0
20/jun/17	0	26	6	0	0	0	0
21/jun/17	3	31	4	0	0	1	0
22/jun/17	2	18	3	0	0	0	0

Anexo III Variação dos parâmetros climáticos avaliados de acordo com os dias de coleta e zonas urbanas

Temperatura	1d	2d	3d	4d	5d	6d	Média	Dp
jul/16	11	18.2	20.1	21.5	16.4	16.8	17.3	3.7
ago/16	23.2	20.5	20.6	21.4	16.9	17.1	20	2.5
set/16	31.5	21.9	21.4	19.7	20.3	20.6	22.6	4.4
out/16	24.7	24.3	27.2	24.1	26.5	26.7	25.6	1.4
nov/16	22.6	23.3	23.1	27.4	23	20.6	23.3	2.2
dez/16	21.3	21.8	23.7	25	26.2	24.8	23.8	1.9
jan/17	29	27.4	23.9	27.2	26.9	25.1	26.6	1.8
fev/17	26.8	25.8	24.9	26.8	25.8	24.9	25.8	0.9
mar/17	25.4	26.1	27.3	22	22.5	22.4	24.3	2.3
abr/17	24.7	28.5	25.7	24.3	20.5	19.4	23.9	3.4
mai/17	21.3	22.2	19	19.6	20.6	23.9	21.1	1.8
jun/17	23.8	24.9	22.5	19.6	19.5	11	20.2	5.0

Umidade	1d	2d	3d	4d	5d	6d	Média	Dp
jul/16	77	86	84	67	83	87	81	6.9
ago/16	54	88	79	87	89	77	79	12.1
set/16	33	73	73	82	82	84	71	17.6
out/16	88	91	80	85	77	77	83	5.4
nov/16	87	92	88	75	97	93	89	6.9
dez/16	94	86	83	95	94	93	91	4.6
jan/17	54	75	89	71	74	88	75	11.7
fev/17	81	71	79	81	76	75	77	3.6
mar/17	87	76	65	83	82	79	79	7.0
abr/17	74	50	80	79	90	85	76	12.8
mai/17	86	83	86	82	83	69	82	5.8
jun/17	73	70	82	87	89	82	81	6.9

Pluviosidade	1d	2d	3d	4d	5d	6d	Média	Dp
jul/16	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
ago/16	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
set/16	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
out/16	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
nov/16	0	0	0	0	0.5	0	0.1	0.0
dez/16	0	0	0	2.1	0	0	0.4	0.9
jan/17	0	0	0	0	1.7	0.1	0.3	0.7
fev/17	1	0	3.2	1.4	0	0	0.9	1.3
mar/17	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
abr/17	0	0	0	0.4	0.4	0	0.1	0.2
mai/17	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
jun/17	0	0	0	0.2	0	0	0.0	0.1

Anexo IV. Tabela de Fonte de repast sanguíneo correlacionando cada amostra de fêmea de *Culex* sp ingurgitada com data e a zona na qual o díptero foi coletado.

N	Data	Armadilha	Zona	Cão	Humano	Galinha	Gato	Bovino	Equino
A01	21/mar	8	U	P	P	P	N	P	P
A02	21/mar	8	U	P	P	P	N	P	N
A03	09/fev	9	U	P	P	P	N	N	N
A06	21/mar	8	U	N	P	P	N	P	N
A07	09/ fev	7	R	N	P	P	N	N	N
A08	08/fev	7	R	N	P	P	N	P	N
A09	23/mar	11	U	P	P	P	N	N	N
A10	15/mar	7	R	P	P	P	N	N	N
A11	21/mar	8	U	P	P	P	N	P	P
A12	15/mar	7	R	P	P	P	N	N	N
A13	15/mar	7	R	P	P	P	N	P	N
A14	22/mar	7	U	P	P	P	N	P	P
A15	26/abr	2	U	P	P	P	N	N	N
A16	26/abr	7	U	P	P	P	N	P	P
A17	23/mar	7	U	N	N	P	N	P	N
A18	26/abr	8	U	P	P	P	N	P	P
A19	10/mai	13	R	N	P	P	N	P	N
A20	11/mai	6	R	P	P	P	P	N	P
A21	11/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A22	09/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A23	09/mai	7	R	P	N	P	N	P	P
A24	09/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A25	09/mai	4	R	N	N	P	N	N	N
A26	09/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A27	09/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A28	09/mai	7	R	N	N	P	N	P	P
A29	09/mai	12	R	P	P	P	N	P	P
A30	09/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A31	09/mai	4	R	N	N	P	N	P	P
A32	09/mai	7	R	N	P	P	N	P	P
A33	06/jun	8	R	P	P	P	N	P	P
A34	24/mai	13	U	N	P	P	N	P	P
A35	10/mai	7	R	N	P	P	N	P	P
A36	09/mai	4	R	N	N	P	N	P	P
A37	09/mai	11	R	N	P	P	N	N	N
A38	24/mai	7	U	N	P	P	N	P	N
A39	06/jun	7	R	P	P	P	N	P	P
A40	09/mai	7	R	N	P	P	N	P	N
A41	09/mai	7	R	N	N	P	N	P	N
A42	09/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A43	09/mai	7	R	N	P	P	N	P	N
A44	24/mai	7	U	N	P	P	N	N	P
A45	24/mai	7	U	N	N	P	N	P	P
A46	09/mai	7	R	N	N	P	N	P	P

N	Data	Armadilha	Zona	Cão	Humano	Galinha	Gato	Bovino	Equino
A47	09/mai	4	R	N	N	P	N	P	P
A48	05/jun	7	R	N	N	P	N	P	P
A49	09/mai	7	R	P	P	P	N	P	P
A50	07/jun	6	R	P	P	P	N	N	N
A51	06/jun	12	R	N	N	P	N	P	P
A52	11/ago	7	U	N	P	P	N	N	N
A53	02/ago	13	R	N	N	P	N	N	N
A54	03/ago	13	R	N	P	P	N	P	N
A55	11/ago	12	U	N	N	N	N	P	P
A56	11/ago	12	U	N	N	P	N	N	N
A57	04/ago	4	R	P	P	P	N	P	P
A58	12/ago	9	U	P	P	P	N	P	P
A59	04/ago	11	R	P	P	P	N	P	N
A60	04/ago	13	R	N	P	P	N	N	N
A61	12/ago	12	U	N	N	P	N	P	P
A62	29/set	15	U	P	P	P	N	P	N
A63	27/set	9	U	N	N	P	N	P	P
A64	27/set	13	U	N	N	P	N	P	N
A65	29/set	15	U	P	P	P	N	P	N
A66	29/set	2	U	P	P	P	N	N	N
A67	26/set	12	U	P	P	P	N	P	P
A68	29/set	15	U	P	P	N	N	P	N
A69	25/set	13	U	N	P	P	N	P	N
A70	25/set	12	U	P	P	P	N	P	P
A71	26/set	15	U	N	P	P	N	N	N
A72	29/set	15	U	N	P	P	N	P	P
A73	13/set	10	R	P	P	P	N	P	N
A74	14/set	15	R	P	P	P	N	P	N
A75	29/set	13	U	P	P	P	N	P	P
A76	14/set	15	R	N	N	N	N	P	N
A77	21/out	13	U	P	P	P	N	P	P
A78	21/out	13	U	P	P	P	N	P	P
A79	20/out	10	U	N	N	P	N	N	N
A80	18/out	13	R	P	P	P	N	P	N
A81	26/out	15	U	P	P	P	N	N	N
A82	20/out	13	U	P	P	P	N	P	N
A83	20/out	13	U	P	P	P	N	P	N
A84	18/out	11	R	P	P	P	N	P	N
A85	18/out	4	R	P	P	N	N	N	N
A86	25/out	8	U	P	P	P	N	P	N
A87	21/out	13	U	P	P	P	N	P	N
A88	20/out	13	U	P	P	P	N	P	N
A89	13/dez	11	U	N	N	P	N	P	N
A90	27/out	15	U	P	P	P	N	P	P

N	Data	Armadilha	Zona	Cão	Humano	Galinha	Gato	Bovino	Equino
A91	12/dez	8	U	N	N	N	N	P	N
A92	12/dez	10	U	P	P	P	N	N	N
A93	13/dez	11	U	N	P	N	P	N	N
A94	14/dez	11	U	P	P	P	N	N	P
A95	13/dez	11	U	N	P	P	N	P	N
A96	12/dez	8	U	N	P	P	P	P	P
A97	05/dez	7	R	N	P	P	N	P	N
A98	12/dez	11	U	N	N	P	N	P	N
A99	12/dez	13	U	N	N	N	N	N	N
A100	12/dez	14	U	N	N	P	N	P	N
A101	12/dez	8	U	N	N	P	N	P	P
A102	12/dez	14	U	N	N	P	N	P	N
A103	05/dez	13	R	P	P	P	N	N	N
A104	14/dez	13	U	P	P	P	N	P	N
A105	05/dez	13	R	N	P	P	N	N	N
A106	13/dez	11	U	N	N	P	N	P	P
A107	12/dez	14	U	N	P	P	N	P	N
A108	05/dez	13	R	N	P	P	N	P	P
A109	12/dez	14	U	N	N	P	P	N	P
A110	12/dez	11	U	N	N	P	N	N	P
A111	09/dez	8	R	P	P	P	N	P	P
A112	12/dez	11	U	N	P	P	P	P	P
A113	12/dez	14	U	P	P	P	N	P	P
A114	12/dez	14	U	N	P	P	N	N	N
A115	12/dez	8	U	P	P	P	N	N	N
A116	12/dez	14	U	P	P	P	N	N	N
A117	05/dez	13	R	P	P	P	N	N	P
A118	06/dez	12	R	N	N	P	P	N	N
A119	12/dez	8	U	P	P	P	N	P	N
A120	07/dez	13	R	P	P	P	N	P	N
A121	12/dez	11	U	P	P	P	N	P	P
A122	05/dez	5	R	P	N	N	N	P	N
A123	05/dez	6	R	N	P	P	N	N	N
A124	05/dez	13	R	P	P	P	N	P	N
A125	05/dez	7	R	N	N	P	N	N	N
A126	05/dez	4	R	N	P	P	N	P	N
A127	05/dez	5	R	P	P	P	N	N	N
A128	05/dez	7	R	N	P	P	N	N	P
A129	05/dez	4	R	P	P	P	N	P	N
A130	05/dez	6	R	N	N	P	N	N	N
A131	05/dez	13	R	N	N	P	N	N	N
A132	06/dez	12	R	N	N	P	P	P	N

N	Data	Armadilha	Zona	Cão	Humano	Galinha	Gato	Bovino	Equino
A133	05/dez	13	R	N	N	N	N	N	N
A134	06/dez	11	R	P	P	P	N	P	N
A135	07/dez	5	R	N	P	P	N	N	N
A136	05/dez	13	R	N	P	P	N	P	N
A137	06/dez	12	R	N	N	P	N	N	N
A138	06/dez	10	R	P	P	P	P	N	P
A139	06/dez	12	R	N	N	P	N	N	N
A140	14/dez	8	U	P	N	N	N	P	N
A141	05/dez	8	R	N	P	P	N	P	P
A142	19/jan	13	U	N	N	P	N	P	P
A143	05/dez	6	U	N	P	P	N	P	N
A144	26/abr	8	U	P	P	P	P	N	N
A145	25/abr	10	U	P	P	P	N	N	N
A146	25/abr	12	U	N	N	P	N	P	N
A147	09/mai	4	R	N	P	P	N	P	P
A148	11/ago	5	U	P	P	P	P	P	P
A149	06/jun	7	R	P	P	P	N	P	N
A150	05/dez	13	R	N	N	P	N	N	N
A151	05/dez	4	R	N	N	P	N	P	N
A152	18/jan	11	R	N	N	P	N	P	N
A153	07/dez	5	R	N	N	P	N	P	N
A154	18/jan	11	R	N	N	P	N	P	N
A155	06/dez	12	R	N	P	P	N	N	N
A156	11/mai	7	R	P	P	P	N	P	N
A157	10/mai	7	R	P	P	P	N	P	N
A158	30/nov	11	U	N	N	P	N	N	N
A159	30/nov	11	U	P	P	P	N	P	N
A160	30/nov	11	U	P	P	P	P	P	N
A161	30/nov	11	U	P	P	N	N	P	N
A162	06/jun	7	R	N	N	P	N	P	N
A163	06/jun	7	R	N	N	P	N	P	N
A164	06/jun	6	R	P	P	P	N	P	P
A165	06/jun	5	R	P	P	P	P	N	N
A166	05/dez	14	R	P	P	P	N	P	N
A167	12/dez	14	U	N	N	P	N	P	N
A168	12/dez	14	U	N	N	P	N	N	N
A169	05/jun	7	R	N	N	P	P	N	N
A170	20/jun	2	U	N	P	P	N	P	N
A171	20/jun	2	U	N	N	P	P	P	P
A172	20/jun	2	U	P	P	N	N	P	N
A173	30/nov	12	U	P	P	P	N	P	P
A174	30/nov	7	U	N	P	P	N	P	P

N	Data	Armadilha	Zona	Cão	Humano	Galinha	Gato	Bovino	Equino
A175	30/nov	11	U	P	P	N	N	P	P
A176	29/nov	11	U	N	P	P	P	P	P
A177	30/nov	11	U	N	P	P	P	P	N
A178	30/nov	2	U	P	P	P	P	P	N
A179	24/nov	14	R	N	P	P	N	P	N
A180	28/nov	8	U	P	P	N	N	P	P
A181	28/nov	7	U	N	P	P	N	N	N
A182	28/nov	7	U	N	P	P	N	N	N
A183	28/nov	8	U	N	N	P	N	N	N
A184	28/nov	7	U	N	P	P	N	N	N
A185	28/nov	8	U	N	N	N	N	P	N
A186	22/nov	10	R	N	P	P	N	P	N
A187	24/nov	10	R	N	P	P	N	P	N
A188	22/nov	10	R	N	N	N	N	N	N
A189	23/nov	10	R	P	P	P	N	P	P
A190	23/nov	6	R	N	P	P	N	N	P
A191	22/nov	6	R	N	P	P	N	P	N
A192	28/nov	8	U	N	P	P	N	P	N
A193	28/nov	10	U	N	P	P	N	N	N
A194	28/nov	11	U	N	P	P	N	P	N
A195	22/nov	14	R	P	P	P	N	P	N
A196	29/nov	3	U	P	P	P	N	P	N
A197	29/nov	12	U	N	N	P	N	P	N
A198	23/nov	4	R	N	P	P	N	P	N
A199	27/out	11	U	N	P	P	N	P	N
A200	22/nov	10	R	N	P	P	N	P	N
A201	22/nov	5	R	P	P	P	N	P	N
A202	22/nov	14	R	N	P	P	N	P	N
A203	23/nov	6	R	N	P	P	N	P	N
A204	29/nov	7	U	N	P	P	N	P	N
A205	29/nov	11	U	N	P	P	N	P	N
A206	29/nov	7	U	P	P	P	N	P	N
A207	28/nov	8	U	P	P	P	N	P	N
A208	29/nov	11	U	N	N	P	N	P	N
A209	12/dez	14	U	N	N	P	N	P	N
A210	21/out	13	R	N	N	N	N	N	N
A211	29/nov	13	U	N	N	P	N	N	N
A212	21/out	13	R	N	N	P	N	N	N
A213	19/jan	13	R	N	N	P	N	P	N
A214	05/dez	7	R	N	N	P	N	P	N
A215	30/nov	2	U	N	N	N	N	N	N
A216	22/nov	10	R	N	N	P	N	P	N
A217	13/dez	14	U	N	N	P	N	N	N
A218	21/out	13	R	N	N	P	N	N	N

N	Data	Armadilha	Zona	Cão	Humano	Galinha	Gato	Bovino	Equino
A220	26/out	15	U	N	N	P	N	N	N
A221	07/dez	6	R	N	N	P	N	P	N
A222	04/ago	13	R	N	P	P	N	P	N
A223	26/out	15	U	N	N	P	N	P	N
A224	20/out	13	R	N	P	P	N	N	N
A225	18/out	11	U	N	P	P	N	P	N
A226	06/dez	7	R	N	P	P	N	N	P
A227	20/out	13	R	N	P	P	P	N	N
A228	22/out	6	R	N	P	P	N	N	N
A229	25/out	15	U	N	P	P	N	P	N
A230	27/out	11	U	N	P	P	N	N	N
A231	25/out	3	U	P	N	P	N	P	N
A231	25/out	3	U	P	N	P	N	P	N
A232	27/out	11	U	P	P	P	N	N	N
A233	27/out	11	U	P	P	P	N	P	N
A234	15/set	15	R	P	P	P	N	N	N
A235	14/set	15	R	P	P	P	N	N	N
A236	15/set	15	R	P	P	P	N	N	N
A237	14/set	15	R	N	P	P	P	P	N
A238	14/set	15	R	N	P	P	P	N	N
A239	13/set	15	R	N	N	N	N	N	N
A240	26/set	13	U	N	P	P	N	N	N
A241	14/set	15	R	N	P	P	P	N	P
A242	25/abr	7	U	N	P	P	N	P	P
A243	29/set	13	U	P	P	P	N	N	N
A244	15/set	15	R	N	N	P	N	N	N
A245	29/set	15	U	P	P	P	N	N	N
A246	29/set	15	U	N	P	P	P	P	P
A247	15/set	15	R	P	P	P	N	P	P
A248	29/set	15	U	N	P	P	N	P	N
A249	27/set	13	U	P	P	P	N	N	N
A250	27/set	15	U	P	P	P	N	N	N
A251	26/set	13	U	N	P	P	P	N	N
A252	11/ago	9	U	P	P	P	N	P	N
A253	12/ago	6	U	N	P	P	N	P	N
A254	07/jul	10	R	N	P	P	N	P	N
A255	07/jul	10	R	N	P	P	N	P	N
A256	13/jul	9	U	N	P	P	N	P	N
A257	06/jul	5	R	P	P	P	N	P	N
A258	07/jul	10	R	N	N	P	N	P	N
A259	13/jul	9	U	N	N	N	N	N	N
A260	13/jul	10	U	N	P	P	N	P	N
A261	25/jan	7	U	N	P	P	N	P	N

N	Data	Armadilha	Zona	Cão	Humano	Galinha	Gato	Bovino	Equino
A262	07/jul	14	R	N	P	P	N	P	N
A263	07/jul	15	R	P	P	P	N	P	N
A264	07/jul	14	R	P	P	P	N	P	N
A265	06/jul	2	R	P	P	P	N	P	N
A266	13/jul	10	U	N	N	P	N	N	N
A267	06/jul	14	R	P	P	P	N	N	N
A268	06/jul	14	R	N	P	P	N	N	N
A269	06/jul	14	R	N	P	P	N	P	N
A270	07/jul	10	R	P	P	P	N	P	N
A271	18/jan	11	R	N	P	P	N	N	N
A272	28/nov	2	U	P	P	N	N	P	N
A273	23/nov	6	R	P	P	P	N	P	N
A274	23/nov	6	R	N	P	P	N	N	N
A275	23/nov	6	R	N	P	P	N	P	N
A276	30/nov	2	U	N	P	N	N	N	N
A277	24/nov	14	R	N	P	P	N	N	N
A278	27/set	2	U	N	P	N	N	N	P
A279	11/ago	15	U	N	P	P	N	P	N
A280	11/ago	11	U	N	P	P	N	N	P
A281	11/ago	11	U	N	P	P	N	N	P
A282	11/ago	15	U	P	P	P	N	N	P
A283	25/set	13	U	N	P	P	N	P	P
A284	11/ago	15	U	P	P	P	N	P	N
A285	07/dez	6	R	N	P	P	N	P	N
A286	24/jan	8	U	N	P	P	N	P	N
A287	17/jan	6	R	N	N	P	P	P	P
A288	25/jan	7	U	N	P	P	P	P	N
A289	25/jan	7	U	P	P	P	N	P	P
A290	31/jan	4	U	P	P	P	N	P	N
A291	24/jan	8	U	N	P	P	P	P	N
A292	14/mar	10	R	N	P	N	N	P	N
A293	29/set	15	U	N	N	N	N	P	P
A294	13/set	6	R	P	P	P	N	P	P
A295	27/out	15	U	P	P	P	P	N	P
A296	14/dez	13	U	P	P	P	P	N	P
A297	13/dez	14	U	N	N	P	N	N	P
A298	25/jan	10	R	P	P	P	N	P	P
A299	13/dez	11	U	N	P	P	P	P	N
A300	05/dez	7	R	P	P	P	N	P	N

Anexo V. Correlação da fonte alimentar em aves com infecção por *Plasmodium* spp. em mosquitos do gênero *Culex*.

N	Data	Nº	Zona	Repasto alimentar em ave	qPCR <i>Plasmodium</i>
A01	21/mar	8	U	P	N
A02	21/mar	8	U	P	N
A03	09/fev	9	U	P	N
A04	09/fev	8	U	N	N
A05	21/mar	8	U	P	N
A06	21/mar	8	U	P	N
A07	14/mar	7	R	P	P
A08	15/mar	7	R	P	P
A09	23/mar	11	U	P	N
A10	15/mar	7	R	P	N
A11	21/mar	8	U	P	N
A12	15/mar	7	R	P	P
A13	15/mar	7	R	P	N
A14	22/mar	7	U	P	P
A15	26/abr	2	U	P	N
A16	26/abr	7	U	P	N
A17	23/mar	7	U	P	P
A18	26/abr	8	U	P	P
A19	10/mai	13	R	P	P
A20	11/mai	6	R	P	P
A21	11/mai	7	R	P	P
A22	09/mai	7	R	P	N
A23	09/mai	7	R	P	P
A24	09/mai	7	R	P	P
A25	09/mai	4	R	P	P
A26	09/mai	7	R	P	P
A27	09/mai	7	R	P	P
A28	09/mai	7	R	P	P
A29	09/mai	12	R	P	P
A30	09/mai	7	R	P	P
A31	09/mai	4	R	P	P
A32	09/mai	7	R	P	P
A33	06/jun	8	R	P	P
A34	24/mai	13	U	P	P
A35	10/mai	7	R	P	P
A36	09/mai	4	R	P	P
A37	09/mai	11	R	P	P

N	DATA	Nº	Zona	Repasto em aves	qPCR <i>Plasmodium</i>
A38	24/mai	7	U	P	P
A39	06/jun/18	7	R	P	P
A40	09/mai	7	R	P	P
A41	09/mai	7	R	P	P
A42	09/mai	7	R	P	P
A43	09/mai	7	R	P	P
A44	24/mai	7	U	P	P
A45	24/mai	7	U	P	N
A46	09/mai	7	R	P	P
A47	09/mai	4	R	P	P
A48	05/jun	7	R	P	P
A49	09/mai	7	R	P	N
A50	07/jun	6	R	P	P
A51	06/jun	12	R	P	P
A52	11/ago	7	U	P	N
A53	02/ago	13	R	P	P
A54	03/ago	13	R	P	P
A55	11/ago	12	U	N	P
A56	11/ago	12	U	P	P
A57	04/ago	4	R	P	P
A58	12/ago	9	U	P	P
A59	04/ago	11	R	P	P
A60	04/ago	13	R	P	P
A61	12/ago	12	U	P	P
A62	29/set	15	U	P	P
A63	27/set	9	U	P	P
A64	27/set	13	U	P	P
A65	29/set	15	U	P	P
A66	29/set	2	U	P	P
A67	26/set	12	U	P	N
A68	29/set	15	U	N	P
A69	25/set	13	U	P	P
A70	25/set	12	U	P	N
A71	26/set	15	U	P	P
A72	29/set	15	U	P	P
A73	13/set	10	R	P	P
A74	14/set	15	R	P	P
A75	29/set	13	U	P	P
A76	14/set	15	R	N	P
A77	21/out	13	U	P	N

N	DATA	Nº	Zona	Repasto em aves	qPCR <i>Plasmodium</i>
A78	21/out	13	U	P	P
A79	20/out	10	U	P	P
A80	18/out	13	R	P	P
A81	26/out	15	U	P	P
A82	20/out	13	U	P	P
A83	20/out	13	U	P	P
A84	18/out	11	R	P	P
A85	18/out	4	R	N	N
A86	25/out	8	U	P	P
A87	21/out	13	U	P	P
A88	20/out	13	U	P	P
A89	13/dez	11	U	P	P
A90	27/out	15	U	P	P
A91	12/dez	8	U	N	N
A92	12/dez	10	U	P	P
A93	13/dez	11	U	N	N
A94	14/dez	11	U	P	P
A95	13/dez	11	U	P	P
A96	12/dez	8	U	P	P
A97	05/dez	7	R	P	P
A98	12/dez	11	U	P	P
A99	12/dez	13	U	N	N
A100	12/dez	14	U	P	P
A101	12/dez	8	U	P	P
A102	12/dez	14	U	P	N
A103	05/dez	13	R	P	P
A104	14/dez	13	U	P	N
A105	05/dez	13	R	P	N
A106	13/dez	11	U	P	P
A107	12/dez	14	U	P	P
A108	05/dez	13	R	P	P
A109	12/dez	14	U	P	P
A110	12/dez	11	U	P	P
A111	09/dez	8	R	P	N
A112	12/dez	11	U	P	P
A113	12/dez	14	U	P	N
A114	12/dez	14	U	P	P
A115	12/dez	8	U	P	N
A116	12/dez	14	U	P	P
A117	05/dez	13	R	P	P

N	Data	Nº	Zona	Repasto	
				alimentar em	qPCR
				ave	<i>Plasmodium</i>
A118	06/dez	12	R	P	P
A119	12/dez	8	U	P	N
A120	07/dez	13	R	P	N
A121	12/dez	11	U	P	P
A122	05/dez	5	R	N	N
A123	05/dez	6	R	P	P
A124	05/dez	13	R	P	P
A125	05/dez	7	R	P	P
A126	05/dez	4	R	P	N
A127	05/dez	5	R	P	N
A128	05/dez	7	R	P	P
A129	05/dez	4	R	P	N
A130	05/dez	6	R	P	N
A131	05/dez	13	R	P	P
A132	06/dez	12	R	P	P
A133	05/dez	13	R	N	N
A134	06/dez	11	R	P	N
A135	07/dez	5	R	P	P
A136	05/dez	13	R	P	P
A137	06/dez	12	R	P	P
A138	06/dez	10	R	P	N
A139	06/dez	12	R	P	P
A140	14/dez	8	U	N	N
A141	05/dez	8	R	P	P
A142	19/jan	13	U	P	P
A143	05/dez	6	U	P	N
A144	26/abr	8	U	P	N
A145	25/abr	10	U	P	P
A146	25/abr	12	U	P	P
A147	09/mai	4	R	P	P
A148	11/ago	5	U	P	P
A149	06/jun	7	R	P	P
A150	05/dez	13	R	P	P
A151	05/dez	4	R	P	P
A152	18/jan	11	R	P	P
A153	07/dez	5	R	P	P
A154	18/jan	11	R	P	P
A155	06/dez	12	R	P	P
A156	11/mai	7	R	P	P
A157	10/mai	7	R	P	N

N	Data	Nº	Zona	Repasto alimentar em	
				ave	qPCR <i>Plasmodium</i>
A158	30/nov	11	U	P	P
A159	30/nov	11	U	P	P
A160	30/nov	11	U	P	P
A161	30/nov	11	U	N	N
A162	06/jun	7	R	P	P
A163	06/jun	7	R	P	P
A164	06/jun	6	R	P	P
A165	06/jun	5	R	P	P
A166	05/dez	14	R	P	N
A167	12/dez	14	U	P	P
A168	12/dez	14	U	P	P
A169	05/jun	7	R	P	P
A170	20/jun	2	U	P	N
A171	20/jun	2	U	P	P
A172	20/jun	2	U	N	N
A173	30/nov	12	U	P	N
A174	30/nov	7	U	P	N
A175	30/nov	11	U	N	N
A176	29/nov	11	U	P	P
A177	30/nov	11	U	P	P
A178	30/nov	2	U	P	P
A179	24/nov	14	R	P	P
A180	28/nov	8	U	N	N
A181	28/nov	7	U	P	P
A182	28/nov	7	U	P	P
A183	28/nov	8	U	P	P
A184	28/nov	7	U	P	P
A185	28/nov	8	U	N	N
A186	22/nov	10	R	P	N
A187	24/nov	10	R	P	P
A188	22/nov	10	R	N	N
A189	23/nov	10	R	P	P
A190	23/nov	6	R	P	P
A191	22/nov	6	R	P	P
A192	28/nov	8	U	P	N
A193	28/nov	10	U	P	P
A194	28/nov	11	U	P	P
A195	22/nov	14	R	P	P
A196	29/nov	3	U	P	N
A197	29/nov	12	U	P	P

N	DATA	Nº	Zona	Repasto em aves	qPCR <i>Plasmodium</i>
A198	23/nov	4	R	P	P
A199	27/out	11	U	P	P
A200	22/nov	10	R	P	P
A201	22/nov	5	R	P	N
A202	22/nov	14	R	P	P
A203	23/nov	6	R	P	P
A204	29/nov	7	U	P	N
A205	29/nov	11	U	P	P
A206	29/nov	7	U	P	P
A207	28/nov	8	U	P	N
A208	29/nov	11	U	P	P
A209	12/dez	14	U	P	P
A210	21/out	13	R	N	N
A211	29/nov	13	U	P	P
A212	21/out	13	R	P	P
A213	19/jan	13	R	P	N
A214	05/dez	7	R	P	N
A215	30/nov	2	U	N	N
A216	22/nov	10	R	P	P
A217	13/dez	14	U	P	P
A218	21/out	13	R	P	P
A219	21/out	13	R	P	N
A220	26/out	15	U	P	P
A221	07/dez	6	R	P	P
A222	04/ago	13	R	P	P
A223	26/out	15	U	P	P
A224	20/out	13	R	P	P
A225	18/out	11	U	P	P
A226	06/dez	7	R	P	P
A227	20/out	13	R	P	P
A228	22/out	6	R	P	P
A229	25/out	15	U	P	P
A230	27/out	11	U	P	P
A231	25/out	3	U	P	N
A232	27/out	11	U	P	N
A233	27/out	11	U	P	P
A234	15/set	15	R	P	N
A235	14/set	15	R	P	P
A236	15/set	15	R	P	N

N	DATA	Nº	Zona	Repasto em aves	qPCR <i>Plasmodium</i>
A237	14/set	15	R	P	P
A238	14/set	15	R	P	P
A239	13/set	15	R	N	P
A240	26/set	13	U	P	P
A241	14/set	15	R	P	P
A242	25/abr	7	U	P	P
A243	29/set	13	U	P	N
A244	15/set	15	R	P	N
A245	29/set	15	U	P	P
A246	29/set	15	U	P	P
A247	15/set	15	R	P	N
A248	29/set	15	U	P	P
A249	27/set	13	U	P	N
A250	27/set	15	U	P	P
A251	26/set	13	U	P	P
A252	11/ago	9	U	P	P
A253	12/ago	6	U	P	P
A254	07/jul	10	R	P	P
A255	07/jul	10	R	P	P
A256	13/jul	9	U	P	N
A257	06/jul	5	R	P	N
A258	07/jul	10	R	P	P
A259	13/jul	9	U	N	N
A260	13/jul	10	U	P	P
A261	25/jan	7	U	P	P
A262	07/jul	14	R	P	P
A263	07/jul	15	R	P	N
A264	07/jul	14	R	P	N
A265	06/jul	2	R	P	N
A266	13/jul	10	U	P	P
A267	06/jul	14	R	P	N
A268	06/jul	14	R	P	P
A269	06/jul	14	R	P	P
A270	07/jul	10	R	P	P
A271	18/jan	11	R	P	P
A272	28/nov	2	U	N	N
A273	23/nov	6	R	P	N
A274	23/nov	6	R	P	P
A275	23/nov	6	R	P	N
A276	30/nov	2	U	N	N

N	DATA	Nº	Zona	Repasto em aves	qPCR <i>Plasmodium</i>
A277	24/nov	14	R	P	P
A278	27/set	2	U	N	N
A279	11/ago	15	U	P	P
A280	11/ago	11	U	P	P
A281	11/ago	11	U	P	N
A282	11/ago	15	U	P	N
A283	25/set	13	U	P	N
A284	11/ago	15	U	P	N
A285	07/dez	6	R	P	N
A286	24/jan	8	U	P	N
A287	17/jan	6	R	P	P
A288	25/jan	7	U	P	P
A289	25/jan	7	U	P	N
A290	31/jan	4	U	P	N
A291	24/jan	8	U	P	N
A292	14/mar	10	R	N	N
A293	29/set	15	U	N	N
A294	13/set	6	R	P	N
A295	27/out	15	U	P	P
A296	14/dez	13	U	P	N
A297	13/dez	14	U	P	P
A298	25/jan	10	R	P	N
A299	13/dez	11	U	P	P
A300	05/dez	7	R	P	N