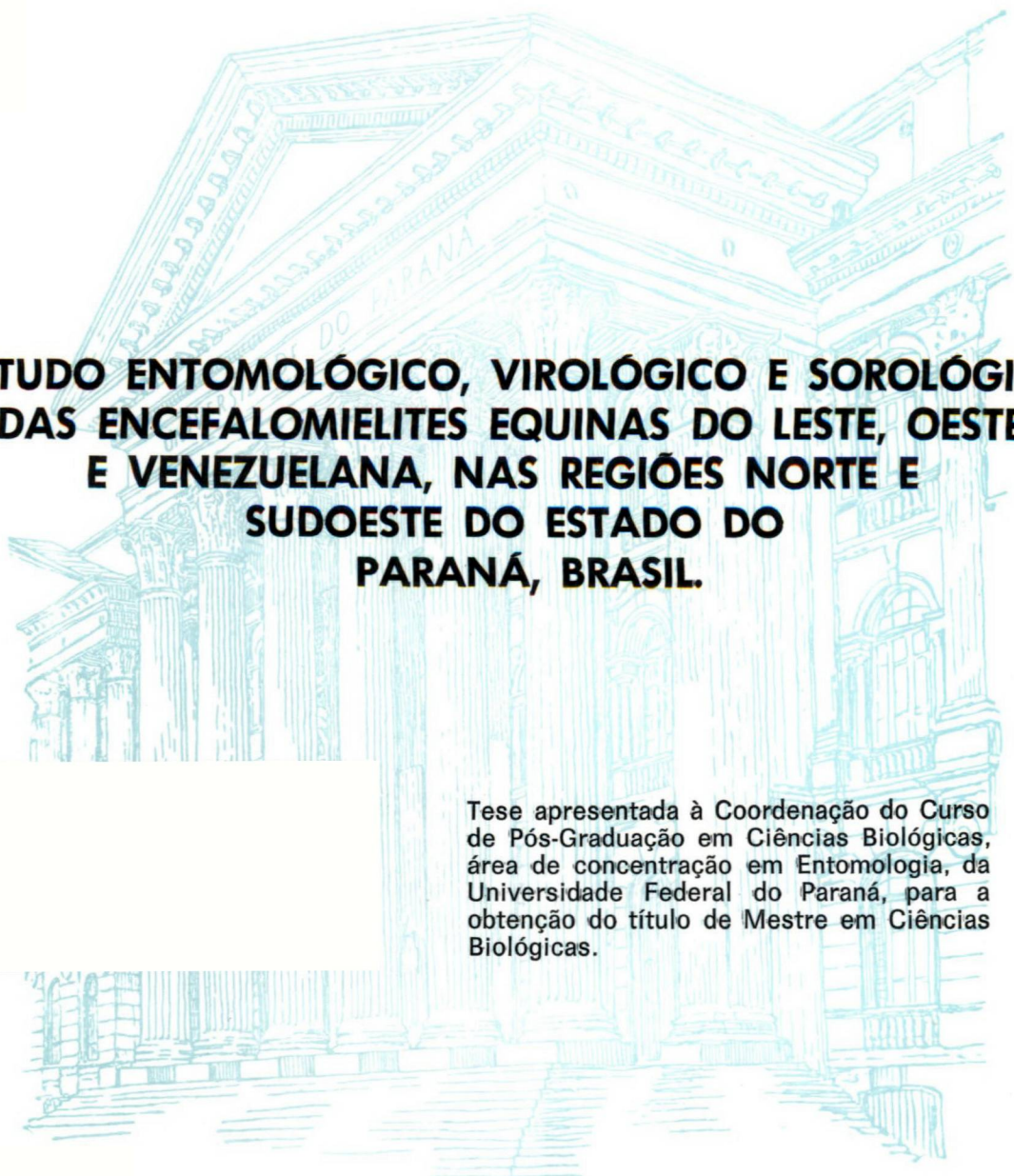


ZORAIDA DEL CARMEN FERNÁNDEZ GRILLO



**ESTUDO ENTOMOLÓGICO, VIROLÓGICO E SOROLÓGICO  
DAS ENCEFALOMIELITES EQUINAS DO LESTE, OESTE  
E VENEZUELANA, NAS REGIÕES NORTE E  
SUDOESTE DO ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL.**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA  
1998

ZORAIDA DEL CARMEN FERNÁNDEZ GRILLO

**ESTUDO ENTOMOLÓGICO, VIROLÓGICO E SOROLÓGICO  
DAS ENCEFALOMIELITES EQUINAS DO LESTE, OESTE  
E VENEZUELANA, NAS REGIÕES NORTE E  
SUDOESTE DO ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL.**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA  
1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ENTOMOLOGIA.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

ESTUDO ENTOMOLÓGICO, VIROLÓGICO E SOROLÓGICO DAS  
ENCEFALOMIELITES EQUINAS DO LESTE, OESTE E  
VENEZUELANA, NAS REGIÕES NORTE E SUDOESTE DO  
ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Elaborada por

ZORAIDA DEL CARMEN FERNÁNDEZ GRILLO.

Como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Comissão Examinadora:



\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Lozovei  
Universidade Federal do Paraná.

\_\_\_\_\_  
Dra. Rosária R. T. De Barros Richartz  
Laboratório Diagnóstico "Marcos Enrietti"



\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Navarro  
Universidade Federal do Paraná



**Dedico este trabalho a  
minha mãe e meus irmãos**

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao concluir este trabalho desejo expressar meus mais sinceros agradecimentos a todas aquelas pessoas, que direta ou indiretamente, colaboraram para sua realização:**

**Ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, pós-graduação em Entomologia, pela minha formação no curso de mestrado.**

**A Dra. Vanete Thomaz Soccol da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, pela orientação do meu trabalho de dissertação.**

**A Dra. Ana Lozovei da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, pela sua participação nos momentos finais da tese.**

**Ao pessoal do Laboratório Centro Diagnóstico “ Marcos Enrietti” da Secretaria da Agricultura do Estado Paraná, pela colaboração e solidariedade prestadas. Em especial a Dra. Rosária Richartz por partilhar seus conhecimentos e experiências de laboratório e por sua grande amizade.**

**A Secretaria da Agricultura do Estado do Paraná, pelo prestado na realização do trabalho.**

**Ao Médico Veterinário Jose Luis Stock, da Secretaria da Agricultura do Estado do Paraná (município Matelândia), porque sem sua ajuda teria sido difícil realizar o trabalho de campo.**

**A D<sup>a</sup>. María Tereza Braz, pela sua amizade e hospitalidade.**

**Ao pessoal da fazenda Rio Butu (município Céu Azul, Estado do Paraná), pela colaboração prestada nas capturas dos mosquitos.**

**Ao Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará, por ter colocado suas instalações a disposição. Ao pessoal do Laboratório de Arbovírus, pela colaboração e convivência; em especial a Dra. Amélia Travassos da Rosa, pela orientação no trabalho de laboratório.**

**Agradeço ao “ Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas de Venezuela (Conicit)” por ter concedido a bolsa de estudos.**

**Ao “ Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (Venezuela)”, pela minha liberação para fazer meu mestrado. A Dra. Rosalba Salas e companheiros do Laboratório de Virología, pelo apoio prestado.**

**Aos meus colegas do curso de mestrado em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, pelo companheirismo, em especial a Chahad e Toma pela sua ajuda no trabalho de campo.**

**A Dra. Mari Anice Sallum da Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, pela ajuda na identificação dos mosquitos.**

**A minha mãe e meus irmãos, pelo apoio e solidariedade em todo momento.**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>PAG</b>
I) CLASSIFICAÇÃO ANTIGÊNICA DOS VÍRUS EEE, WEE E VEE.....	06
II) ESPÉCIES DE CULICÍDEOS COLETADAS POR MODALIDADE DE CAPTURA, NAS DIFERENTES LOCALIDADES DO ESTADO DO PARANÁ. VALORES ABSOLUTOS E PERCENTUAIS DE INDIVÍDUOS POR LOCALIDADE.....	30
III) NÚMERO DE MOSQUITOS COLETADOS, NÚMERO DE GRUPOS DE MOSQUITOS FORMADOS E NÚMERO DE CAMUNDONGOS INOCULADOS, POR LOCALIDADE, PARA TENTATIVA DE ISOLAMENTO DE ARBOVÍRUS.....	35
IV) RESULTADOS DA SOROLOGIA PELO TESTE DE IH FRENTE AOS VÍRUS EEE, WEE, MUC, PIX, ILH, TCM, SLE, CAR E CATU.....	36
V) ANTICORPOS IH E N PARA O VÍRUS EEE EM SOROS DE EQÜINOS COLHIDOS NOS MUNICÍPIOS COLORADO E QUERÊNCIA DO NORTE.....	37

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAG
1) A: Mapa do Brasil, destacando o Estado do Paraná; B: Mapa do Estado do Paraná, destacando as áreas de estudo; 1: Município Querência do Norte; 2: Município de Colorado; 3: Sítio Novo Oeste, município Vera Cruz do Oeste; 4: Fazenda Rio Butu, município Céu Azul; 5: Reserva Florestal Foz de Iguaçu, município Céu Azul.....	17
2) Sítio Novo Oeste, município Vera Cruz do Oeste. Foto do capão onde foram efetuadas as coletas de culicídeos.....	18
3) Fazenda Rio Butu, município Céu Azul. Foto do capão onde foram realizadas as coletas de culicídeos.....	18
4) Foto da Reserva Florestal Foz de Iguaçu, município Céu Azul.....	20
5) Município Querência do Norte. Foto de uma das áreas selecionadas para coletar culicídeos.....	20



## LISTA DE ABREVIATURAS.

- Encefalomielite eqüina do Leste: **EEE.**
- Encefalomielite eqüina do Oeste: **WEE**
- Encefalomielite eqüina Venezuelana: **VEE**
- Highlands J: **HJ**
- Fort Morgan: **FM**
- Sindbis: **SIN**
- Everglades: **EVE**
- Mucambo: **MUC**
- Pixuna: **PIX**
- Cabassou: **CAB**
- Ilheus: **ILH**
- Tacaiuma: **TCM**
- St. Luis: **SLE**
- Caraparu: **CAR**
- Catu: **Catu**
- Maguari: **MAG**
- Teste de inibição da hemaglutinação: **teste IH**
- Teste de neutralização: **teste de N.**
- Anticorpos inibidores da hemaglutinação: **anticorpos IH**
- Anticorpos neutralizantes: **anticorpos N.**
- Logaritmo do índice de neutralização: **LIN.**

## RESUMO

Na época de verão do ano 1997, foi realizado um estudo virológico e sorológico em mosquitos e em amostras de sangue de eqüinos, para os vírus causadores de Encefalomielite eqüina do Leste (EEE), Encefalomielite eqüina do Oeste (WEE) e Encefalomielite eqüina Venezuelana (VEE), nas localidades: sítio Novo Oeste (município Vera Cruz de Oeste), fazenda Rio Butu (município Céu Azul), Reserva Florestal Foz de Iguaçu (município Céu Azul), município Querência do Norte e município Colorado, situadas ao Sudoeste e Norte do Estado do Paraná, Brasil. Um total de 32 espécies de culicídeos foi identificado, sendo as mais abundantes *Culex (Culex) grupo coronator*, *Culex (Culex) declarator*, *Culex (Culex) bidens/mollis/nigrus*, *Culex (Melanoconion) sp.*, *Aedes scapularis*, *Aedes serratus*, *Trichoprosopon pallidoventer*, *Psorophora sp.*, *Sabethes sp.*, *Wyeomyia sp.*, *Limatus sp.* Um total de 22 amostras de sangue de eqüinos e 1883 culicídeos foram processados no Laboratório de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará), na tentativa de identificar o agente causador da encefalomielite nos eqüinos das regiões mencionadas. Os testes sorológicos revelaram a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação e neutralizantes para os arbovírus Encefalomielite eqüina do Leste, Ilheus, St. Luis e Maguari, nos soros de eqüinos. No entanto, os testes virológicos revelaram a ausência de vírus nas amostras de culicídeos e de sangue de eqüinos inoculadas em camundongos.

## SUMMARY.

In summer of 1997, a virologic and serologic study, with mosquitoes and equine's blood, were realized for East equine encephalitis (EEE), West equine encephalitis (WEE) and Venezuelan equine encephalitis virus (VEE). The localities selected were: Novo Oeste place (Vera Cruz do Oeste county), Rio Butu farm (Céu Azul county), "Reserva Florestal Foz de Iguaçu (Céu Azul county), Querência do Norte county and Colorado county, located at North and Southwest of Paraná State, Brazil. Were identified 32 species of mosquitoes and the more abundant were *Culex (Culex) grupo coronator*, *Culex (Culex) declarator*, *Culex (Culex) bidens/mollis/nigrus*, *Culex (Melanoconion) sp.*, *Aedes scapularis*, *Aedes serratus*, *Trichoprosopon pallidoventer*, *Psorophora sp.*, *Sabethes sp.*, *Wyeomyia sp.*, *Limatus sp.* Were collected 22 samples of equine's blood and 1883 mosquitoes. These material was analysed at Arbovirus Laboratory of Evandro Chagas Institute (Belém, Pará), with the objective of identify the encephalitis virus that affected the equines populations in the studied areas. The results obtained with serologic tests demonstrate the presence of hemagglutination inhibition and neutralization antibodies for East equine encephalitis, Ilheus, St. Louis and Maguari virus in equines sera, but, the virologic tests expressed absence of virus in the mosquitoes and equine's blood samples.

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>IX</b>
<b>Summary.....</b>	<b>X</b>
<b>Sumário.....</b>	<b>XI</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Revisão da Literatura.....</b>	<b>04</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>16</b>
1) Áreas de estudo e época de coleta.....	16
2) Métodos de coleta e conservação do material.....	21
2.1) Coleta e conservação de mosquitos.....	21
2.2) Coleta e conservação dos soros de eqüinos.....	22
3) Estudos virológicos e sorológicos.....	23
3.1) Pesquisa virológica.....	23
3.1.1) Preparação do macerado de mosquitos.....	24
3.1.2) Preparação do sangue de eqüinos.....	24
3.1.3) Inoculação em camundongos.....	24
3.2) Testes sorológicos.....	25
3.2.1) Teste de Inibição da hemaglutinação.....	25
3.2.2) Teste de Neutralização.....	26

<b>4. Resultados.....</b>	<b>28</b>
1) Populações de culicídeos.....	28
2) Estudos virológicos em culicídeos.....	33
3) Estudos virológicos e sorológicos em sangue de eqüinos.....	35
3.1) Estudos virológicos.....	35
3.2) Tesde de inibição da hemaglutinação.....	35
3.3) Teste de neutralização.....	36
<b>5. Discussão.....</b>	<b>38</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>48</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>50</b>
Anexo I. Reativos e soluções.....	50
Anexo II. Esquema de neutralização usado para o vírus EEE.....	55
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>56</b>

## INTRODUÇÃO

Os arbovírus são vírus mantidos na natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos ou de hospedeiro artrópode à hospedeiro artrópode através da via transovariana (WHO Technical Report Series No. 719, 1985).

Eles constituem o maior grupo conhecido de vírus com cerca de 535 membros registrados no "Catalogue of Arthropod-borne and selected Vertebrate Viruses of the World". Aproximadamente 100 destes infectam ao homem, 40 infectam animais domésticos e pelo menos 10 podem causar epidemias (KARABATSOS, 1985; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1996).

Estes vírus estão distribuídos em seis famílias: *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Rhabdoviridae* (gênero *Vesiculovirus*), *Bunyaviridae* (gêneros *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Uukuvirus*), *Reoviridae* (gêneros *Orbivirus* e *Coltivirus*) e *Iridoviridae* com o vírus da Febre Suína Africana (MONATH, 1988; FIELDS *et al.*, 1996; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1996).

No gênero *Alphavirus*, são conhecidos três vírus que estão amplamente distribuídos no Continente Americano e que têm grande importância epidemiológica: o vírus da Encefalomielite Equina do Oeste (WEE), o vírus da Encefalomielite Equina Venezuelana (VEE) e o vírus da Encefalomielite Equina do Leste (EEE) (MONATH, 1988; FIELDS *et al.*, 1996).

As primeiras manifestações, em eqüinos, de encefalomiélites de origem viral no Estado do Paraná, foram observadas nos anos 1910-1930. Posteriormente, foram observados casos similares em outras regiões do país (WIGG, 1977).

RICHARTZ (1994) realizando um inquérito sorológico em eqüinos de diferentes regiões do Estado Paraná, determinou presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus EEE, VEE e WEE.

No ano de 1996, foram recebidos no Laboratório Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti" (Curitiba, Paraná), soros de eqüinos procedentes do município Vera Cruz do Oeste, com suspeita clínica para vírus de encefalomiélites. O teste de inibição da hemaglutinação revelou a presença de anticorpos para os vírus VEE, WEE e EEE. No entanto, não foram efetuados testes que revelassem resultados mais específicos. Posteriormente, cavalos do município Céu Azul apresentaram sinais de encefalomiélite. Os testes sorológicos adequados não foram realizados porque os animais já tinham sido vacinados.

No início do ano 1997, alguns eqüinos do município Querência do Norte, na cidade Querência do Norte, Estado do Paraná, apresentaram quadros clínicos similares aos manifestados pelos cavalos das regiões mencionadas acima. Em setembro foram constatados alguns casos no

município de Colorado, Estado do Paraná.

No Estado do Paraná, além do estudo realizado por RICHARTZ (1994), não foram publicados estudos virológicos e sorológicos. Nenhum trabalho tem sido realizado na tentativa de isolar vírus nas espécies potenciais vetores.

Considerando os resultados obtidos por RICHARTZ (1994), e os sintomas observados nos eqüinos, acredita-se que, nas regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná, poderia estar circulando alguma das encefalomiélites eqüinas, EEE, WEE ou VEE. Devido a escassa informação epidemiológica existente nas áreas afetadas, propomo-nos neste trabalho:

- 1- fazer um levantamento de espécies de culicídeos presentes nas respectivas regiões;
- 2- tentar isolar o vírus causador da encefalomiélite a partir dos culicídeos, assim como isolar qualquer outro arbovírus que esteja presente neles, nas respectivas regiões;
- 3- fazer estudos sorológicos e virológicos nos eqüinos com suspeita clínica para encefalomiélite.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### PRIMEIROS ESTUDOS DE ALPHAVIRUS

Os estudos com os *Alphavirus* iniciaram-se com o isolamento do vírus WEE a partir do cérebro de um cavalo, em 1930, durante epizootia na Califórnia (EUA) (MEYER *et al.*, 1931). Posteriormente HOWITT (1938) isolou o mesmo vírus em humanos. Em 1933, no Estado de New Jersey, (EUA), foi isolado pela primeira vez o vírus EEE de um cavalo com encefalomielite (TEN BROECK & MERRIL, 1933). Mais tarde, este vírus foi obtido e identificado de material humano por FOTHERGILL *et al.* (1938) e WEBSTER & WRIGHT (1938). O vírus VEE foi descoberto por KUBES & RIOS (1939) em cérebros de eqüinos provenientes da Península da Guajira (Venezuela) durante uma epidemia acontecida em 1938 nessa região. Os estudos dos *Alphavirus* continuaram e ampliou-se bastante o número de vírus isolados. Em 1954, CASALS & BROWN classificaram os 20 vírus até então conhecidos, com base em seus relacionamentos antigênicos, criando o Grupo sorológico A (OLIVEIRA, 1994).

### CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VÍRUS EEE, WEE E VEE

Os vírus EEE, WEE E VEE, estão taxonomicamente agrupados na família *Togaviridae* gênero *Alphavirus* e sorologicamente incluídos no Grupo A da classificação universal dos arbovírus. Estes vírus possuem ácido ribonucleico (ARN) de fita simples e aspecto linear não segmentado.

Apresentam um coeficiente de sedimentação que varia de 250 - 275 S (Svedberg) e são estáveis na faixa de pH de 6,0 a 9,0. São sensíveis aos solventes lipídicos e detergentes, sendo rapidamente inativados pela ação da radiação ultravioleta e à temperatura de 56° C, mas são relativamente resistentes à tripsina. Apresentam como estrutura um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica que está envolvido por um envelope constituído por uma dupla membrana lipídica contendo duas glicoproteínas específicas para cada tipo viral, E1 e E2. A glicoproteína E1 funciona como hemaglutinina e a E2 como indutora de anticorpos neutralizantes (MONATH, 1988). Estes arbovírus têm muita relação entre si, quando considerado o aspecto morfológico, biofísico, bioquímico e as respostas antigênicas. Os vírus WEE e EEE apresentam maior afinidade sorológica (MONATH, 1988; FIELDS *et al.*, 1996). PETERS & DALRYMPLE (1990), propuseram uma classificação antigênica destes arbovírus, mostrada a seguir na Tabela I.

TABELA I: CLASSIFICAÇÃO ANTIGÊNICA DOS VÍRUS EEE, WEE E VEE.

Complexo Antigênico	Espécie (vírus)	Subtipo	Variedade
Encefalomielite eqüina do Oeste (WEE)	WEE e 62-63 Highlands J (HJ) Fort Morgan (FM) Aura Sindbis (SIN)	Vários    Sindbis Babanki Kyzylagach	Ockelbo
Encefalomielite eqüina Venezuelana (VEE)	VEE	I I I I I II Everglades (EVE) III Mucambo (MUC)  IV Pixuna (PIX) V Cabassou (CAB) VI AG80 - 660	A - B C D E F  MUC Tonate 71 D - 1252
Encefalomielite eqüina do Leste (EEE)	EEE		América do Norte  América do Sul

FONTE: PETERS &amp; DALRYMPLE (1990)

As espécies contidas no complexo antigênico WEE causam meningoencefalite aguda no homem e em eqüinos. A percentagem de

mortalidade no homem, nos casos de encefalomyelites, é de 2 a 3% e em eqüinos é de 25% (BERAN & STEELE, 1994; OLIVEIRA, 1994).

As infecções humanas causadas pelo vírus WEE têm-se produzido principalmente nos Estados Unidos (MONATH, 1988). Na América do Sul, o WEE foi isolado na Argentina, Uruguai, Brasil, Guiana e Equador, onde é responsável por alguma morbidade em eqüinos e aves. Casos humanos associados a esta arbovirose têm sido raros (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

As variedades AB e C do subtipo I do vírus VEE são causadoras de epizootias, enquanto os outros subtipos são enzoóticos e aparentemente não virulentos para os eqüinos. No entanto, alguns subtipos como MUC, EVE e PIX, produzem doença humana. Em eqüinos a taxa de mortalidade é de 10 a 15% e em humanos, a maioria dos casos de encefalomyelites e mortes ocorre em crianças (MONATH, 1988; OLIVEIRA, 1994; WEAVER, 1998).

O vírus VEE ocorre no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Trinidad, Panamá e México. Na natureza é mantido por roedores e mosquitos, e no ciclo urbano, os eqüinos são os principais hospedeiros virêmicos (MONATH, 1988; VASCONCELOS *et al.*, 1991).

Quanto ao complexo antigênico EEE existem duas variedades, a variedade que ocorre na costa oriental da América do Norte e a variedade da América do Sul. A primeira, atinge o homem e os eqüinos e é causadora de

uma grave encefalomielite com uma mortalidade em humanos de 25 a 75% (desconhece-se este dado em eqüinos). A variedade da América do Sul apresenta um potencial baixo de infecção para o homem e os eqüinos não sendo assinalados casos de mortalidade (OLIVEIRA, 1994).

O vírus EEE ocorre principalmente na costa Leste dos Estados Unidos, no final do verão e princípio do outono. Na América do Sul e no Caribe também foram obtidos isolamentos do vírus em eqüinos e aves, sendo os casos humanos escassos (MONATH, 1988; VASCONCELOS *et al.*, 1991; WHITE & FENNER, 1994).

#### **CICLOS DE TRANSMISSÃO DOS VÍRUS EEE, WEE E VEE**

Os *Alphavirus* WEE, EEE e VEE são mantidos na natureza por ciclos de transmissão que envolvem os mosquitos como vetores e os roedores e aves, como hospedeiros vertebrados. O homem e os eqüinos são considerados hospedeiros “acidentais” (BEER, 1988; MONATH, 1988).

O principal vetor do vírus WEE, em áreas urbanas dos Estados Unidos, é o *Culex (Culex) tarsalis* Coquiliet, 1896 (VASCONCELOS *et al.*, 1991; BERAN & STEELE, 1994). No Brasil, foi isolado a partir de *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921 oriundos da região de Linhares, Estado do Espírito Santo (WIGG, 1977) e das espécies *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (Wiedemann, 1828), *Culex (Melanoconion) pedroi* Sirivanakarn &

Belkin, 1980 e *Culex (Melanoconion) portesi* Senevet & Abonnenc, 1941, coletados na Amazônia brasileira (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Na Argentina foi isolado de *Culex (Melanoconion) grupo ocosa*, *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* Macquart, 1839, *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch Arribalzaga, 1878, *Mansonia sp.* e *Psorophora (Psorophora) pallescens* Edwards, 1922, durante um surto epizootico (MITCHELL *et al.*, 1985).

Nos Estados Unidos, os hospedeiros vertebrados deste vírus são pássaros como andorinhas (Hirundinidae), melros e pardais (Emberizidae) (MONATH, 1988; OLIVEIRA, 1994). No Brasil, principalmente, na Amazônia, foi isolado de aves das famílias Formicariidae e Tyrannidae (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

No ciclo silvestre do VEE o vetor é o *Culex (Melanoconion) sp.*, mas também tem sido isolado em: *Mansonia (Mansonia) titillans* (Walker, 1848), *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* (Wiedmann, 1821), *Aedes (Ochlerotatus) sollicitans* (Walker, 1856), *Aedes (Ochlerotatus) thelcter* Dyar, 1918, *Trichoprosopon (Shannoniana) digitatum* (Rondani, 1848), *Haemagogus sp* e *Anopheles (Stethomyia) nimbus* (Theobald, 1902) (CUPP, 1979). No ciclo urbano, além do *Culex (Melanoconion)*, podem estar envolvidas espécies dos gêneros *Aedes*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Anopheles* (WALDER *et al.*, 1984b; CUPP, 1985; MITCHELL *et al.*, 1987; MONATH, 1988; VASCONCELOS *et al.*, 1991; TURELL, 1992).

Os principais hospedeiros vertebrados do vírus VEE são roedores. No Brasil, na Amazônia e região Sudeste, o ciclo enzoótico do subtipo MUC desse vírus é mantido por roedores Cricetidae (*Orizomys capito*) (VASCONCELOS *et al.*, 1991; OLIVEIRA, 1994). O subtipo PIX foi isolado de um rato da espécie *Proechimys guyannensis* (Echimyidae), coletado na Amazônia (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

A variedade da América do Norte do vírus EEE é principalmente transmitido, enzooticamente, por *Culiseta (Allotheobaldia) melanura* (Coquillett, 1902). Outros mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Coquillettidia*, sugando aves virêmicas, podem transmitir o vírus aos eqüinos e ao homem (CRANS & SCHULZE, 1986). Este vírus tem sido isolado enzooticamente nas Américas Central e do Sul nas espécies *Culex (Melanoconion) dunni* Dyar, 1918, *Culex (Melanoconion) panocossa* Dyar, 1923, *Culex (Melanoconion) sacchettae* Sirivanakarn & Jakob, 1981 e *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar & Knab, 1907. Esta última espécie é reconhecida como vetor enzoótico do EEE no Brasil e Trinidad (WALDER *et al.*, 1984a; LETSON *et al.*, 1993; VASCONCELOS *et al.*, 1991)

A transmissão do vírus EEE aos humanos e eqüinos ocorre principalmente pelas espécies: *Aedes sollicitans*, *Aedes (Ochlerotatus) canadensis* (Theobald, 1901), *Aedes (Aedimorphus) vexans* (Meigen, 1830), *Coquillettidia (Coquillettidia) perturbans* (Walker, 1856), *Aedes taeniorhynchus* (LETSON *et al.*, 1993; VASCONCELOS *et al.*, 1991). Isolamentos

obtidos em *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) colocam esta espécie como possível vetor epizoótico do vírus, mas até agora não foi comprovado (MITCHELL *et al.*, 1992).

Na América do Norte, o vírus EEE tem como hospedeiros vertebrados aves selvagens (grous, garças, codornizes) e aves domésticas como faisão (MONATH, 1988). Na América do Sul, o EEE é encontrado infectando aves silvestres das famílias Icteridae, Formicariidae, Thraupidae e Tyrannidae. A ave da espécie *Thamnophilus aethiops* (Formicariidae) parece desempenhar importante papel na manutenção do vírus na Amazônia (VASCONCELOS *et al.*, 1991; OLIVEIRA, 1994).

#### **ESTUDOS SOBRE OS VÍRUS EEE, WEE E VEE NO BRASIL**

No Brasil, no ano 1918, aconteceram as primeiras manifestações dos vírus WEE e EEE, numa criança da Bahia e outra do Rio de Janeiro, respectivamente (WIGG, 1977). Outros casos de EEE em humanos foram encontrados ao Norte do Brasil, sem que apresentassem alterações sérias do sistema nervoso.

Na Amazônia, embora existam evidências sorológicas de infecções por este vírus em residentes de certas localidades, não há indícios da ocorrência de surtos de encefalomielite. Estes resultados permitiram fazer maiores pesquisas do vírus, encontrando-se diferenças antigênicas entre os



vírus isolados na América do Norte e na América do Sul (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

Em eqüinos, as primeiras manifestações de encefalomielite foram observadas no Estado do Paraná nos anos 1910-1930. O vírus foi isolado e reproduzido em cobaios sem que se chegasse a uma identificação do mesmo (WIGG, 1977). Posteriormente, CARNEIRO (1937), num surto acontecido em eqüinos no Estado de São Paulo, isolou e identificou o vírus como EEE. A partir daí, foram realizados estudos em cavalos de diferentes regiões do Brasil, comprovando-se a existência da virose em Minas Gerais, Nordeste Brasileiro e Rio de Janeiro (WIGG, 1977). Outros isolamentos desse vírus foram efetuados posteriormente por CUNHA (1943) em Pernambuco; ALICE (1951) na Bahia; NILSON & SUGAY (1962) em Itaporanga, São Paulo.

O primeiro isolamento, em eqüinos, do vírus WEE (amostra No. 1257), foi obtido por BRUNO-LOBO *et al.* (1961), no Rio de Janeiro. Esta amostra foi sorologicamente relacionada com a espécie SIN do complexo antigênico WEE.

TRAVASSOS DA ROSA *et al.* (1961), realizando inquérito sorológico em eqüinos, para os vírus WEE, EEE, VEE e amostra No. 1257, obtiveram percentagens significativas da presença de anticorpos nas amostras estudadas e verificaram existir identidade entre a amostra local No. 1257 e o protótipo do WEE.

Em 1963, foram realizados estudos na Amazônia brasileira, para estabelecer o papel das aves silvestres na epidemiologia de arboviroses. Nas amostras de órgãos e plasmas inoculados em camundongos, foi isolado o vírus EEE, a partir de uma amostra da espécie *Rhamphocelus carbo* (Thraupidae) e outra, da espécie *Mionectes oleaginea* (Tyrannidae) (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Posteriormente, cinco outros isolamentos foram obtidos em espécies das famílias Icteridae e Formicariidae. Nessa pesquisa, também foi isolado o vírus WEE, em 1964, a partir do sangue de uma ave silvestre da espécie *Myrmotherula huxwelli* (Formicariidae). Anticorpos IH para o vírus WEE, confirmados por N, foram encontrados em 72 espécies de aves silvestres residentes na floresta. Casos em humanos ou eqüinos não foram registrados (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

Os subtipos III e IV do vírus VEE foram isolados na Amazônia brasileira. O subtipo III (cepa BE AN 8) foi isolado pela primeira vez por CAUSEY *et al.* (1961), em macaco sentinela do gênero *Cebus*, numa localidade próxima de Belém, Pará. Esta cepa foi diferenciada do vírus VEE e classificada como MUC por SHOPE *et al.* (1964). Em 1970, este vírus foi isolado na região da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, em camundongos sentinelas (WIGG, 1977).

Em 1961, foi isolado e caracterizado, pela primeira vez, o subtipo IV do vírus VEE (cepa BE AR 35645), de um "pool" de mosquitos da espécie

*Anopheles nimbus*, coletados no Km 94 da estrada Belém - Brasília. Este vírus foi classificado como PIX (SHOPE *et al.*, 1964).

Em 1967, SILVA *et al.* realizaram um inquérito sorológico em residentes do Estado da Bahia e demonstraram a existência de anticorpos para os três vírus: WEE, EEE e VEE (WIGG, 1977).

Em 1975, dois isolamentos novos foram obtidos por CALISHER *et al.* (1975) de um "pool" de *Culex (Melanoconion)* e de um morcego da espécie *Carollia perspicillata* (cepas 78V-3531 e SP AN 50783, respectivamente), no Vale da Ribeira (São Paulo). Estes vírus foram caracterizados como subtipo I, variante F, do vírus VEE.

MATTOS (1970 e 1975), trabalhando com soros de animais silvestres capturados em algumas regiões do Estado do Rio de Janeiro e, soros humanos de residentes do Rio Grande do Sul, evidenciou a existência de anticorpos IH para os três *Alphavirus*.

IVERSSON *et al.* (1981) realizaram estudos sorológicos, em população humana do Vale do Ribeira (Estado de São Paulo). Das 516 amostras testadas 34 (6,59%), apresentaram anticorpos IH para o vírus MUC, 29 (5,62%) para o vírus EEE e, 11 (2,13%) para o vírus WEE. Anticorpos para outros arbovírus também foram detectados.

IVERSSON *et al.* (1993) fizeram um inquérito sorológico em eqüinos, no Pantanal brasileiro, para arbovírus causadores de encefalomyelites. Entre os 432 soros testados, 29 (6,7%) apresentaram anticorpos N para EEE e 5 (1,2%) para WEE. Também realizaram teste de fixação do complemento para soros pareados de um cavalo doente e acharam evidências de infecção recente pelo vírus EEE. Em outras amostras revelou-se infecção passada pelo vírus WEE.

FERREIRA *et al.* (1994) realizaram inquéritos sorológicos em aves silvestres da Mata Atlântica (Estado de São Paulo) e detectaram anticorpos IH para os vírus EEE, WEE e VEE, entre outros arbovírus. No Vale do Ribeira, foram capturadas espécies de aves residentes de hábitos migratórios (*Thraupis palmarum*, *Columbina talpacoti* e *Guira guira*) e uma espécie migratória (*Machetornis rixosus*), que apresentaram anticorpos IH para o vírus EEE.

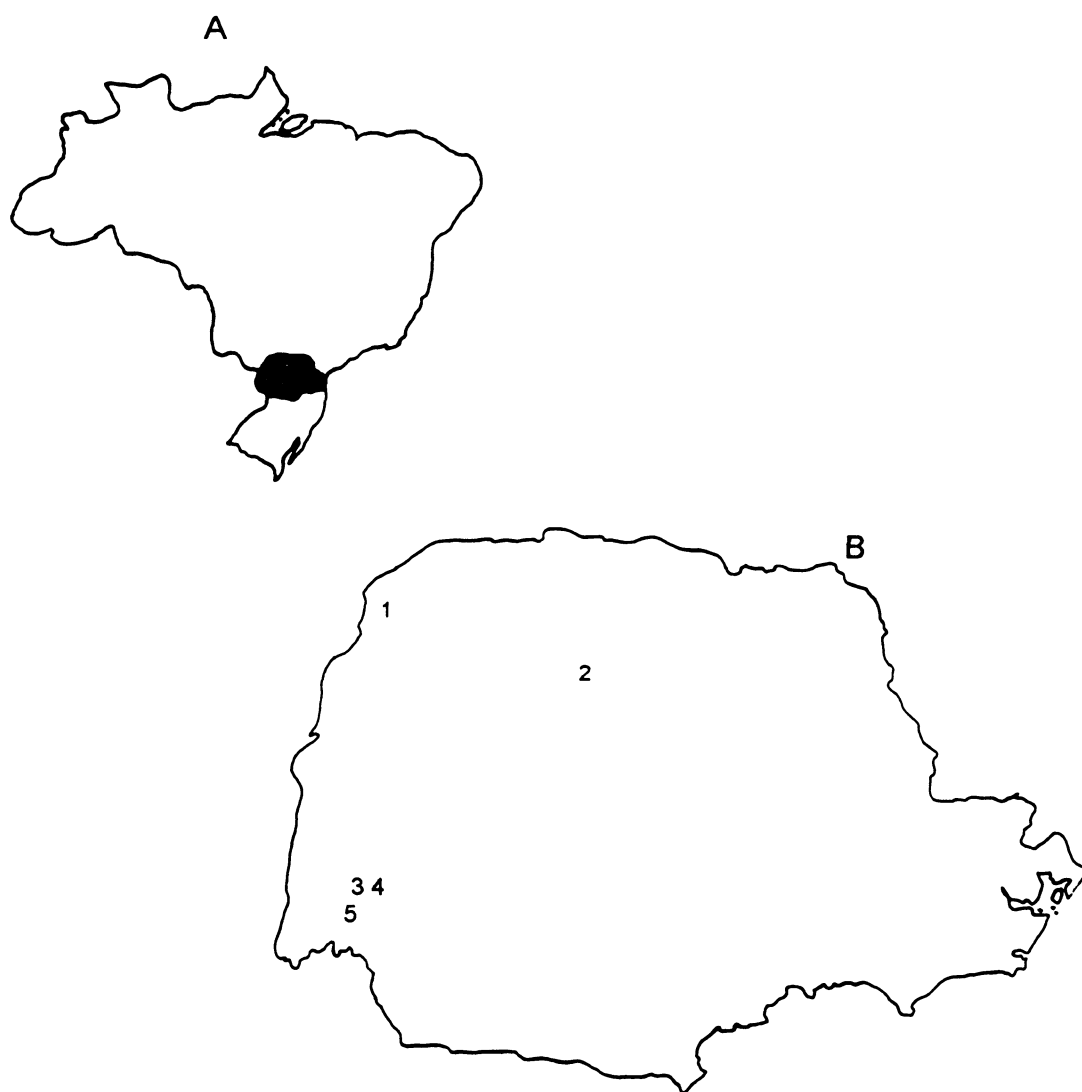
RICHARTZ (1994) fez um inquérito sorológico, em diferentes regiões do Estado do Paraná, para os três *Alphavirus*. Entre as 816 amostras analisadas, detectou anticorpos IH para os vírus VEE (19,24%), EEE (15,32%) e WEE (30,39%). Dos soros reagentes, 11 apresentaram título de 1:640 para o vírus EEE, 4 para WEE e 4 para VEE.

#### 1) Áreas de estudo e época de coleta

O estudo foi efetuado no Estado do Paraná, na época de verão do ano 1997, nas seguintes localidades:

- 1) sítio Novo Oeste, situado no município Vera Cruz do Oeste, em latitude 25° 30' e longitude 54° 30' (rodovia PR 488, sentido Céu Azul a Vera Cruz do Oeste);
- 2) Agropecuária Rio Butu, situada no município Céu Azul, em latitude 25° 30' e longitude 54° 30' (rodovia BR 277, Km 620);
- 3) Reserva Florestal Foz de Iguaçu, município Céu Azul, em latitude 25° 30', 26° 30' e longitude 54° 30' (a 300 mts. da rodovia BR 277);
- 4) município Querência do Norte, em latitude 23° 30' e longitude 54° 30' e,
- 5) município Colorado em latitude 23° 30' e longitude 52° 30' (Fig. 1).

As coletas de culicídeos foram realizadas no sítio Novo Oeste, na fazenda Rio Butu, na Reserva Florestal Foz de Iguaçu e no município Querência do Norte. No sítio Novo Oeste, com uma extensão de 36,3 ha., foram feitas as coletas num capão pequeno que ficava próximo das casas (Fig. 2). Esse local era percorrido por um rio e era freqüentado pelos cavalos durante o dia. A fazenda Rio Butu ocupa uma área de 847 ha. As coletas foram feitas num capão situado distante da área domiciliar, onde os cavalos costumavam pastar. Este capão era extenso e estava próximo de um açude (Fig. 3).



**FIG.1. A: Mapa do Brasil, destacando o Estado do Paraná; B: Mapa do Estado do Paraná, destacando as áreas de estudo; 1: Município Querência do Norte; 2: Município de Colorado; 3: Sítio Novo Oeste, município Vera Cruz do Oeste; 4: Fazenda Rio Butú, município Céu Azul; 5: Reserva Florestal Foz de Iguaçu, município Céu Azul.**



FIG. 2. Sítio Novo Oeste, município Vera cruz do Oeste. Foto do capão onde foram efetuadas as coletas de culicídeos.



FIG. 3. Fazenda Rio Butu, município Céu Azul. Foto do capão onde foram realizadas as coletas de culicídeos.

Na Reserva Florestal Foz de Iguaçu que ocupa 185 ha. abarcando 11 municípios do Estado: Foz de Iguaçu, Santa Teresina de Itaipu, Serranópolis, Matelândia, São Miguel de Iguaçu, Céu Azul, Santa Teresa do Oeste, Lindo Oeste, Capitão Leonidas Marques e Capanema (IBAMA, comunicação pessoal). As coletas foram feitas no município Céu Azul, perto de uma lagoa que era freqüentada por aves, macacos e outros animais silvestres (Fig. 4). No município Querência do Norte, os locais de coleta estavam alagados e eram também freqüentados por aves, cavalos e outros animais domésticos (Fig. 5).

As amostras de sangue foram colhidos de eqüinos não vacinados, nos municípios Querência do Norte e Colorado. No sítio Novo Oeste e na fazenda Rio Butu, os cavalos foram vacinados antes de iniciar o trabalho de campo, portanto, não foi feita a coleta de sangue nessas regiões.

Para fazer uma descrição geográfica geral da região, considerou-se as informações colocadas pelo MAACK (1981). Segundo o autor, o Estado do Paraná é formado por regiões de paisagens naturais. As regiões pesquisadas estão situadas dentro da Zona climática tropical - subtropical, com uma temperatura média anual de 20,7 ° C e uma precipitação pluvial anual de 1712 mm, sendo março o mês mais chuvoso com 231 mm, e agosto, o mês mais seco com 74 mm. A vegetação é uma mistura de mata pluvial subtropical, áreas de pastoreio e áreas de plantações.





FIG. 4. Foto da Reserva Florestal Foz de Iguaçu, município Céu Azul.



FIG. 5. Município Querência do Norte. Foto de uma das áreas selecionadas para coletar culicídeos

A Reserva Florestal Foz de Iguaçu é rica em espécies leguminosas, epífitas, bromeliáceas, aráceas, orquídeas e lianas (MAACK, 1981). As outras áreas são extensões de pasto, culturas e capões que se desenvolvem sobre solos férteis de terra roxa.

Um total de onze viagens foram realizadas, com uma duração de três dias cada uma. Nos municípios de Vera Cruz do Oeste e Céu Azul, o período de captura de mosquitos foi entre janeiro e maio, com uma frequência de duas vezes ao mês. Em Querência do Norte as coletas de mosquitos e soros de cavalos foram feitas no início do mês de julho e, no município de Colorado, os soros de eqüinos foram colhidos ao final do mês de setembro.

## **2) Métodos de coleta e conservação do material**

### **2.1) Coleta e conservação de mosquitos**

Em todas as áreas foram feitas capturas preliminares para conhecer a fauna de culicídeos, utilizando isca humana, armadilha luminosa Shannon (SHANNON, 1939), e armadilha luminosa CDC - modificada (NATAL *et al.*, 1991). As coletas com isca humana foram feitas por duas pessoas, no período das 10:00 até às 14:00 horas, e das 16:00 até às 19:00 horas. As coletas com armadilha Shannon foram realizadas das 19:00 até às 2:00 horas da manhã do dia seguinte, usando um lampião a gás e isca humana para atrair os mosquitos. As coletas com armadilha luminosa CDC, foram feitas das 18:00 até às 6:00 horas do outro dia.

Os mosquitos foram sacrificados com clorofórmio e colocados em caixinhas devidamente rotuladas (data, local, hora e método de coleta). No laboratório, este material foi montado, mantido em gavetas e identificado, usando as chaves adequadas (FORATTINI, 1962, 1965 a, 1965 b; 1996; FORATTINI & SALLUM, 1997; LANE, 1953 a, 1953 b).

Para tentativa de isolamento de vírus, os mosquitos foram coletados com isca humana e armadilha Shannon, nos horários citados acima. Posteriormente, foram anestesiados a frio e transferidos para tubos de vidro devidamente rotulados (data, local, hora e método de coleta), lacrados com fita durex e colocados em botijão de nitrogênio líquido para transporte. No laboratório, os tubos foram transferidos para um botijão de nitrogênio líquido (-180 ° C) com capacidade de 40 litros e mantido nessa temperatura até ser processado (CHAMBERLAIN & SUDIA, 1975; CEPANZO, 1982; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992).

## **2.2) Coleta e conservação dos soros de eqüinos**

As amostras de sangue (22 amostras), foram colhidas da veia jugular de eqüinos que não possuíam mais que dois anos de idade, não tinham registro de vacina e apresentavam os sintomas característicos de encefalomielite: febre, falta de coordenação motora, falta de apetite, perda do equilíbrio e fraqueza. Estes animais costumavam pastar em alagadiços e pântanos, onde existiam criadouros de larvas de mosquitos.

O sangue colhido foi imediatamente aliquotado em duas partes: uma para tentativa de isolamento de vírus e outra para estudos sorológicos. Para tentativa de isolamento, foi separado 1 ml de sangue, sendo mantido e conservado no congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  até manipulação. Para estudos sorológicos, quantidades superiores de sangue foram separadas e deixadas em repouso até retração do coágulo para posterior separação do mesmo. Os soros obtidos foram colocados em vidros estéreis com etiqueta de identificação, e mantidos no congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem processados. Estas amostras estavam acompanhadas de uma ficha de identificação contendo informações sobre o animal, local e data da coleta.

### **3) Estudos virológicos e sorológicos**

Os reativos e soluções utilizados seguiram o protocolo indicado por TRAVASSOS DA ROSA *et al.* (1992) (Anexo 1).

#### **3.1) Pesquisa virológica**

Os mosquitos e as amostras de sangue colhidos para pesquisa de arbovírus, foram processados no laboratório de arbovírus do Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará). No laboratório, os mosquitos coletados foram colocados sobre uma mesa refrigerada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para serem separados por espécie, formando grupos de no máximo 40 indivíduos. Os grupos formados, foram mantidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  até serem processados.

As espécies foram identificadas utilizando as chaves adequadas (FORATTINI, 1962, 1965 a, 1965 b; 1996; FORATTINI & SALLUM, 1997; LANE, 1953 a, 1953 b).

### **3.1.1) Preparação do macerado de mosquitos** (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992)

Após identificação, os mosquitos mantidos à - 70 °C foram macerados usando o procedimento utilizado no Instituto Evandro Chagas: preparou-se o diluente, constituído por uma solução de Borato - salina (PBS) que contém albumina bovina a 0,75% e antibióticos (Penicilina 100 u/ml e Estreptomicina 100 µ/ml). Dentro de uma câmara de fluxo laminar, os grupos de mosquitos formados, foram triturados em gral de porcelana e suspensos em 2 ml de PBS, até formar uma pasta homogênea. Os macerados obtidos foram, colocados em tubos de hemólise e, mantidos em frio (4° C) numa estante. Cada suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm e temperatura de 4 °C e depois mantida em frio (4° C) até ser inoculada.

### **3.1.2) Preparação do sangue dos eqüinos** (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992)

As amostras de sangue colhidas, foram diluídas 1:10 em PBS contendo albumina bovina a 0,75% e antibióticos.

### **3.1.3) Inoculação em camundongos** (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992)

Para cada suspensão, seja de mosquito ou de sangue de eqüinos, foi

selecionada uma família de camundongos brancos "Swiss" (seis filhos de até três dias de idade e uma mãe). Cada filhote foi inoculado por via intracerebral (ic), com 0,02 ml da suspensão de mosquito ou de sangue. Os camundongos foram revisados diariamente por um período de 21 dias, anotando todas as observações usando o seguinte código: ?, desaparecido; +, morto; M, moribundo; E, estragado; D, doente; +-, sacrificado. Os animais que apresentaram sinais de doença ou mudanças de comportamento foram sacrificados para fazer novas passagens: numa cabine de fluxo laminar, o cérebro do camundongo foi retirado, macerado em gral de porcelana e suspenso em 2 ml de PBS com albumina bovina a 0,75% e antibióticos. O macerado foi centrifugado por 10 minutos, a 4000 rpm e 4°C. O sobrenadante obtido foi inoculado em camundongos, seguindo o procedimento mencionado acima.

### **3.2) Testes sorológicos**

**3.2.1) Teste de inibição da hemaglutinação (IH)** (CLARKE & CASALS, 1958; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992)

A escolha deste teste foi por sua facilidade de execução e sensibilidade. Os soros dos eqüinos foram tratados com acetona para remover os inibidores inespecíficos da hemaglutinação, e adsorvidos por hemácias de ganso, para remover as aglutininas naturais que podem causar resultados falsos - negativos. No final, os soros estavam diluídos 1:20 nas hemácias de ganso, e prontos para serem testados.

Inicialmente foi feita uma triagem dos soros na diluição 1:20, contra os seguintes antígenos: EEE, WEE, MUC, PIX, SLE, ILH, MAG, TCM, Catu, e CAR.

Em paralelo, foi realizada a titulação dos antígenos nos pHs e temperaturas apropriados (Anexo 1), para controlar os títulos ótimos de trabalho de cada um deles, ou seja, 4 unidades hemaglutinantes em 0,025 ml do antígeno. Os soros que deram positivos, ou seja, aqueles que formaram botão (inibição da hemaglutinação), foram titulados contra os antígenos específicos. Numa placa em U, foram distribuídos 0,025 ml do soro-teste e adicionados 0,025 ml do antígeno em 4 unidades hemaglutinantes. A placa foi incubada a 4 ° C "overnight". Na manhã seguinte, foram acrescentados 0,05 ml de glóbulos de ganso, diluídos em pH apropriado (Anexo 1). A placa foi agitada e incubada por 30 minutos a temperatura adequada (de acordo com o tipo de vírus testado). A leitura da placa foi realizada e o título IH foi tido como a mais alta diluição do soro que causou completa ou quase completa inibição da hemaglutinação.

**3.2.2) Teste de Neutralização (TN) (em camundongos recém-nascidos, com diluição constante do soro e concentrações variadas do vírus) (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992)**

Este teste revela resultados mais específicos que o teste de IH e permitiu esclarecer as reações cruzadas obtidas com alguns soros.

O vírus considerado foi diluído 1:5 em diluente (PBS contendo 0,75 % de albumina bovina e antibióticos), e posteriormente diluído 1:10 até a diluição  $10^{-10}$ . Cada soro testado, inclusive o homólogo, foi avaliado contra dois, três ou quatro diluições do vírus (Anexo 2).

Numa estante foram colocados os tubos rotulados para cada soro (soros testados, soro homólogo e controle negativo). Para cada caso foram adicionados 0,025 ml da amostra, 0,075 ml do diluente e 0,1 ml das diluições do vírus. Em outros tubos foram colocados 0,1 ml de cada diluição usada na titulação do vírus e 0,1 ml do diluente. A estante foi agitada e incubada a 37 ° C, por uma hora. Depois foi removida do banho maria e colocada em banho de gelo. Para cada tubo foram inoculados seis camundongos de até três dias de idade por via intracerebral (i.c.) (0,02 ml de cada mistura), os quais foram observados diariamente por um período de 15 dias fazendo as devidas anotações (usando o código mencionado na seção 3.1.3).

Os resultados foram expressos como o logaritmo do índice de neutralização (LIN). Este valor é obtido subtraindo o valor da diluição que protegeu o 50% dos animais, de uma quantidade específica do vírus (LD50), quer dizer, a prova é positiva, quando o soro tem anticorpos para o vírus e pelo menos 50% dos camundongos inoculados sobrevivem (SHOPE & SATHER, 1979).



## 4. RESULTADOS

### 1) Populações de culicídeos

As espécies de culicídeos coletadas em todas as localidades estudadas, tanto para montagem quanto para estudo virológico, estão citadas na seguinte lista (FORATTINI, 1962; 1965a; 1965b):

*Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848)

*Aedes (Ochlerotatus) serratus* (Theobald, 1901)

*Aedes (Ochlerotatus) rhyacophilus* Costa Lima, 1933

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

*Aedes (Protomacleaya) terrens* (Walker, 1856)

*Aedes (Finlaya) argyrothorax* Bonne & Bonne-Wepster, 1920

*Aedeomyia (Aedeomyia) squamipennis* (Lynch Arribalzaga, 1878)

*Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* Gabaldon, Cova-Garcia & Lopez, 1941

*Coquillettidia (Rhynchotaenia) venezuelensis* (Theobald, 1912)

*Culex (Culex) declarator* Dyar & Knab, 1906

*Culex (Culex) grupo coronator*

*Culex (Melanoconion) sp*

*Chagasia rozeboomi* Causey, Deane & Deane, 1944

*Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924)

*Limatus flavisetosus* Castro, 1935

*Limatus durhami* Theobald, 1901

*Limatus psedomethisticus* (Bonne-Wepster & Bonne, 1919)

*Mansonia (Mansonia) titillans* (Walker, 1848)

*Mansonia (Mansonia) pseudotitillans* (Theobald, 1901)

*Phoniomyia quasilongirostris* (Theobald, 1907)

*Phoniomyia teobaldi* Lane & Cerqueira, 1942

*Psorophora (Janthinosoma) albigenu* (Lutz, 1908)

*Psorophora (Janthinosoma) albipes* (Theobald, 1907)

*Psorophora (Janthinosoma) lutzii* (Theobald, 1901)

*Psorophora (Janthinosoma) ferox* (Humboldt, 1819)

*Sabethes (Sabethinus) aurescens* (Lutz, 1905)

*Sabethes (Sabethinus) identicus* Dyar & Knab, 1907

*Sabethes (Sabethinus) intermedius* (Lutz, 1904)

*Sabethes (Sabethoides) chloropterus* (Humboldt, 1819)  
*Sabethes (Sabethes) albiprivus* Lutz, 1903

*Shannoniana fluviatilis* (Theobald, 1903)

*Trichoprosopon (Trichoprosopon) pallidoventer* (Lutz, 1905)  
*Trichoprosopon (Trichoprosopon) obscurum* Lane & Cerqueira, 1942

*Uranotaenia apicalis* Theobald, 1903  
*Uranotaenia geometrica* Lutz, 1901  
*Uranotaenia lowi* Theobald, 1901

*Wyeomyia (Wyeomyia) limai* Lane & Cerqueira, 1942  
*Wyeomyia (Dendromyia) personata* (Lutz, 1904)

Um total de 250 culicídeos foram coletados para montagem e identificação. Destes, 145 (58%) foram capturados com isca humana, 68 (27,2%) com armadilha Shannon e 37 (14,8%) com armadilha CDC - modificada (Tabela II).

As espécies de culicídeos coletadas usando diferentes modalidades de captura estão citadas na tabela II. Em todas as localidades onde as coletas foram realizadas, foram identificadas e montadas 32 espécies. No sítio Novo Oeste foram coletadas 7 espécies, na fazenda Rio Butu 14 espécies, na Reserva Florestal Foz de Iguaçu 14 espécies e em Querência do Norte 8 espécies.

No sítio Novo Oeste foram coletados 29 espécimes, dos quais 20 (68,9%) são do gênero *Culex (Culex)*. Neste subgênero foram identificadas as espécies *Culex (Culex) grupo coronator* e *Culex (Culex) declarator*. Na fazenda Rio Butu, dos 106 indivíduos capturados, 72 (67,9%) pertencem ao gênero *Culex (Culex)*, sendo identificadas as espécies *Culex grupo*

*coronator* e *Culex declarator*. Há dúvida na identificação de algumas espécies deste subgênero sendo citadas como *Culex (Culex) bidens/mollis/nigrus*. Espécies da tribo Sabethini foram identificadas, aparecendo com maior frequência *Trichoprosopon pallidoventer* com 13 (12,3%) indivíduos. Na Reserva Florestal Foz de Iguaçu, dos 31 espécimes capturados 29 (93,5%) são da tribo Sabethini, sendo os gêneros *Sabethes* (29%) e *Wyeomyia* (25,8%) os mais frequentes. No município Querência do Norte foram capturados 84 culicídeos, dos quais 35 (41,7%) são da espécie *Aedes scapularis* e 20 (23,8%) da espécie *Aedes serratus*. As espécies *Psorophora albigenu*, *Psorophora albipes* e *Psorophora lutzi*, foram identificadas representando 14,3% do total de indivíduos capturados na localidade.

**TABELA II: ESPÉCIES DE CULICÍDEOS COLETADAS POR MODALIDADE DE CAPTURA, NAS LOCALIDADES SÍTIO NOVO OESTE (SNO), FAZENDA RIO BUTU (FRB), RESERVA FLORESTAL FOZ DE IGUAÇU (RFFI) E QUERENCIA DO NORTE (QDN), ESTADO DO PARANÁ. NÚMERO DE INDIVÍDUOS POR LOCALIDADE.**

LOCALIDADE	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	MODALIDADE DE CAPTURA		
			CDC	SH	IHU
SNO *	<i>Anopheles benarrochi</i>	01	01	0	0
	<i>Anopheles sp</i>	02	02	0	0
	<i>Aedes aegypti</i>	01	01	0	0
	<i>Aedes rhyacophilus</i>	01	0	01	0
	<i>Aedes scapularis</i>	01	0	01	0
	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	02	02	0	0
	<i>Culex grupo coronator</i>	13	13	0	0
	<i>Culex declarator</i>	04	04	0	0
	<i>Culex (Culex) sp.</i>	03	03	0	0
	<i>Psorophora (Janthinosoma) sp</i>	01	01	0	0
	<b>TOTAL</b>	29	27	02	0

## Continuação da Tabela II:

<b>SNO **</b>	<i>Aedes scapularis</i>	01	0	01	0
	<i>Culex grupo coronator</i>	01	0	0	01
	<i>Culex declarator</i>	15	0	03	12
	<i>Culex (Culex) sp</i>	20	0	02	18
	<i>Sabethes intermedius</i>	10	0	0	10
	<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>0</b>	<b>06</b>	<b>41</b>
<b>FRB *</b>	<i>Anopheles sp</i>	01	01	0	0
	<i>Aedes scapularis</i>	03	0	03	0
	<i>Aedes terrens</i>	02	0	02	0
	<i>Culex (Culex) bidens/mollis/nigrus</i>	57	03	29	25
	<i>Culex grupo coronator</i>	08	02	02	03
	<i>Culex declarator</i>	06	01	03	02
	<i>Culex (Culex) sp</i>	01	01	0	0
	<i>Coquillettidia venezuelensis</i>	01	01	0	0
	<i>Haemagogous leucocelaenus</i>	02	0	02	0
	<i>Limatus durhami</i>	01	0	01	0
	<i>Mansonia pseudotitillans</i>	01	01	0	0
	<i>Sabethes aurescens</i>	04	0	04	0
	<i>Sabethes chloropterus</i>	01	0	01	0
	<i>Shannoniana fluviatilis</i>	04	0	04	0
	<i>Trichoprosopon pallidoventer</i>	13	0	13	0
	<i>Wyeomyia limai</i>	01	0	01	0
	<b>TOTAL</b>	<b>106</b>	<b>10</b>	<b>66</b>	<b>30</b>
<b>FRB **</b>	<i>Aedes scapularis</i>	30	0	02	28
	<i>Chagasia rozeboomi</i>	02	0	0	02
	<i>Culex grupo coronator</i>	02	0	0	02
	<i>Culex declarator</i>	40	0	0	40
	<i>Culex (Culex) sp</i>	25	0	04	21
	<i>Coquillettidia venezuelensis</i>	03	0	0	03
	<i>Haemagogous leucocelaenus</i>	06	0	0	06
	<i>Limatus durhami</i>	01	0	0	01
	<i>Sabethes aurescens</i>	01	0	0	01
	<i>Sabethes intermedius</i>	11	0	0	11
	<i>Trichoprosopon pallidoventer</i>	41	0	0	41
		<i>Wyeomyia sp</i>	16	0	0
	<b>TOTAL</b>	<b>178</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>172</b>
	<i>Culex (Culex) bidens/mollis/nigrus</i>	01	0	0	01
	<i>Culex grupo coronator</i>	01	0	0	01
	<i>Limatus flavisetosus</i>	02	0	0	02

## Continuação da Tabela II:

RFFI *	<i>Phoniomyia quasilongirostris</i>	03	0	0	03
	<i>Phoniomyia teobaldi</i>	02	0	0	02
	<i>Sabethes albiprivus</i>	05	0	0	05
	<i>Sabethes aurescens</i>	01	0	0	1
	<i>Sabethes chloropterus</i>	02	0	0	02
	<i>Sabethes identicus</i>	01	0	0	01
	<i>Trichoprosopon pallidoventer</i>	05	0	0	5
	<i>Wyeomyia airosai/howardii</i>	01	0	0	01
	<i>Wyeomyia (Dendromyia) sp</i>	01	0	0	01
	<i>Wyeomyia limai</i>	01	0	0	01
	<i>Wyeomyia personata</i>	05	0	0	05
		<b>TOTAL</b>	31	0	0
RFFI **	<i>Aedes argyrothorax</i>	09	0	0	09
	<i>Aedes scapularis</i>	01	0	0	01
	<i>Chagasia rozeboomi</i>	12	0	07	05
	<i>Culex grupo coronator</i>	13	0	03	10
	<i>Culex (Culex) sp</i>	04	0	0	04
	<i>Culex (Melanoconion) sp</i>	01	0	0	01
	<i>Haemagogous leucocelaenus</i>	26	0	07	19
	<i>Limatus durhami</i>	30	0	06	24
	<i>Limatus pseudometisticus</i>	03	0	0	03
	<i>Limatus sp</i>	16	0	0	16
	<i>Phonyomyia quasilongirostris</i>	164	0	12	152
	<i>Sabethes albiprivus</i>	56	0	15	41
	<i>Sabethes aurescens</i>	01	0	0	01
	<i>Sabethes chloropterus</i>	02	0	0	02
	<i>Sabethes intermedius</i>	106	0	30	76
	<i>Sabethes sp.</i>	01	0	0	01
	<i>Trichoprosopon obscurum</i>	92	0	03	89
	<i>Trichoprosopon pallidoventer</i>	277	0	32	245
	<i>Wyeomyia sp.</i>	471	0	54	417
	<b>TOTAL</b>	1285	0	169	1116
QDN *	<i>Aedes scapularis</i>	35	0	0	35
	<i>Aedes serratus</i>	20	0	0	20
	<i>Culex grupo coronator</i>	01	0	0	01
	<i>Culex (Culex) sp</i>	03	0	0	03
	<i>Psorophora albigena</i>	08	0	0	08
	<i>Psorophora albipes</i>	02	0	0	02
	<i>Psorophora lutzii</i>	01	0	0	01

## Continuação da Tabela II:

QDN *	<i>Psorophora (Janthinosoma) sp</i>	01	0	0	01
	<i>Uranotaenia apicalis</i>	04	0	0	04
	<i>Uranotaenia geometrica</i>	04	0	0	04
	<i>Uranotaenia sp</i>	04	0	0	04
	<i>Wyeomyia sp</i>	01	0	0	01
	<b>TOTAL</b>	<b>84</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>84</b>
QDN **	<i>Aedes scapularis</i>	242	0	0	242
	<i>Aedes serratus</i>	44	0	0	44
	<i>Aedes sp</i>	22	0	0	22
	<i>Culex grupo coronator</i>	01	0	0	01
	<i>Culex declarator</i>	01	0	0	01
	<i>Culex (Melanoconion) sp</i>	04	0	0	04
	<i>Mansonia titillans</i>	01	0	0	01
	<i>Psorophora albipes</i>	31	0	0	31
	<i>Psorophora ferox</i>	06	0	0	06
	<i>Psorophora lutzii</i>	03	0	0	03
	<i>Uranotaenia geometrica</i>	10	0	0	10
	<i>Uranotaenia lowi</i>	08	0	0	08
	<b>TOTAL</b>	<b>373</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>373</b>

CDC= CDC- modificada

SH= Shannon

IHU= Isca humana

\* = Espécimes coletados para montagem

\*\* = Espécimes coletados para estudos virológicos

**2) Estudos virológicos em culicídeos**

Um total de 1883 culicídeos foram coletados para tentativa de isolamento de arbovírus, nas localidades estudadas. As 25 espécies, coletadas, nesta etapa do trabalho, são apresentadas na tabela II. Algumas delas não aparecem no material coletado para montagem e vice-versa.

No sítio Novo Oeste foram coletados 47 espécimes distribuídos em 4 espécies, sendo o gênero *Culex* (*Culex*) com 36 indivíduos (76,6%) o mais abundante. Na fazenda Rio Butu foram coletados 178 indivíduos agrupados em 10 espécies. As espécies coletadas com maior frequência foram *Culex declarator* com 40 (22,5%) indivíduos, *Aedes scapularis* com 30 (16,8%) indivíduos e, *Trichoprosopon pallidoventer* com 41 (23,03%) indivíduos. Houve uma boa representação da tribo Sabethini com os gêneros *Wyeomyia* com 16 (9%) indivíduos e *Sabethes* com 12 (6,7%) indivíduos. Na Reserva Florestal Foz de Iguaçu, foram capturados 1285 indivíduos de 15 espécies diferentes, sendo o 95% da tribo Sabethini. No município Querência do Norte, foram coletados 373 indivíduos distribuídos em 11 espécies, sendo as mais abundantes as espécies *Aedes scapularis* com 242 (64,9%) exemplares, *Aedes serratus* com 44 (11,8%) indivíduos e *Psorophora albipes* com 31 (8,3%) indivíduos.

Com este material foram inoculados 618 camundongos (Tabela III). Estes animais não revelaram sintomas de doença, portanto, não houve isolamento de vírus.

**TABELA III: NÚMERO DE MOSQUITOS COLETADOS, NÚMERO DE GRUPOS DE MOSQUITOS FORMADOS E NÚMERO DE CAMUNDONGOS INOCULADOS, POR LOCALIDADE, PARA TENTATIVA DE ISOLAMENTO DE ARBOVÍRUS.**

<b>LOCALIDADE</b>	<b>NÚMERO INDIVÍDUOS COLETADOS</b>	<b>NÚMERO DE GRUPOS FORMADOS</b>	<b>NÚMERO DE CAMUNDONGOS INOCULADOS</b>
SÍTIO NOVO OESTE	47	04	24
FAZENDA RIO BUTU	178	11	66
RESERVA FLORESTAL FOZ DE IGUAÇU	1285	67	402
QUERÊNCIA DO NORTE	373	21	126
<b>TOTAL</b>	<b>1883</b>	<b>103</b>	<b>618</b>

### **3) Estudos virológicos e sorológicos em sangue de eqüinos**

#### **3.1) Estudos virológicos**

As 22 amostras de sangue colhidas nos cavalos foram inoculadas em 132 camundongos. Os animais não apresentaram nenhum sintoma suspeito para encefalomielite. No entanto, foram realizadas passagens cegas em camundongos e após 21 dias de observação, não foram detectados sinais clínicos compatíveis com encefalomielites. Segundo estes resultados, não houve isolamento de vírus.

#### **3.2) Teste de Inibição da hemaglutinação:**

A maioria das amostras apresentou anticorpos para pelo menos um dos seguintes arbovírus: EEE, MUC, PIX, MAG, ILH e SLE (Tabela V).



Doze (59,9%) dos 22 soros testados, apresentaram anticorpos para o vírus EEE, 4 (18,2%) para o vírus MUC, 3 (13,6%) para o vírus PIX, 11 (50%) para o vírus MAG, 10 (45,5%) para o vírus SLE e, 2 (9,1%) para o vírus ILH.

**TABELA IV: RESULTADOS DO TESTE IH FRENTE AOS VÍRUS EEE, WEE, MUC, PIX, ILH, TCM, SLE, CAR E CATU (NÚMERO DE SOROS POSITIVOS/ SOROS TESTADOS).**

MUNICÍPIO	EEE	WEE	MUC	PIX	MAG	ILH	SLE	TCM	CAR	CATU
QUERÊNCIA DO NORTE	8/14	0/14	4/14	0/14	8/14	0/14	6/14	0/14	0/14	0/14
COLORADO	4/8	0/8	0/8	3/8	3/8	2/8	4/8	0/8	0/8	0/8
<b>TOTAL</b>	<b>12/22</b>	<b>0/22</b>	<b>4/22</b>	<b>3/22</b>	<b>11/22</b>	<b>2/22</b>	<b>10/22</b>	<b>0/22</b>	<b>0/22</b>	<b>0/22</b>

### 3.3) Teste de neutralização:

Entre os vírus EEE e PIX houve três reações cruzadas e, entre o vírus EEE e MUC houve quatro. Para esclarecer estes resultados foi efetuado o teste de neutralização para os doze soros que revelaram anticorpos IH para o vírus EEE, utilizando o esquema do anexo 2. Na Tabela VI são apresentados os valores de anticorpos IH e N para o vírus EEE. Os valores de LIN obtidos foram maiores do que 1,8 permitindo afirmar que todas as 12 (54,5%) amostras testadas tinham anticorpos N para o vírus EEE. Os soros com maiores valores de LIN expressam títulos de anticorpos superiores contra o vírus.

**TABELA V: ANTICORPOS IH E N PARA O VÍRUS EEE EM SOROS DE EQUINOS COLHIDOS NOS MUNICÍPIOS COLORADO E QUERÊNCIA DO NORTE.**

<b>SORO</b>	<b>TÍTULO ANTICORPOS IH</b>	<b>LIN</b>
<b>01</b>	1:80	2,0
<b>02</b>	1:40	3,1
<b>03</b>	1:80	3,7
<b>04</b>	1:40	2,3
<b>05</b>	1:40	2,3
<b>06</b>	1:40	3,3
<b>07</b>	1:80	2,0
<b>08</b>	1:40	3,6
<b>09</b>	1:40	>2,9
<b>10</b>	1:40	>2,9
<b>11</b>	1:40	2,0
<b>12</b>	1:20	3,7

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho a isca humana e a armadilha Shannon permitiram coletar maior número de indivíduos e de espécies de mosquitos em relação a armadilha CDC- modificada. Segundo os trabalhos realizados por diferentes autores em outras regiões do Estado do Paraná, estes métodos parecem ser os mais eficientes na captura de culicídeos. BARBOSA *et al.* (1993), no município de Terra Boa, na região Norte do Estado, realizaram coletas de culicídeos com armadilhas Shannon e de Falcão e, obtiveram melhor rendimento com a armadilha Shannon (2996 indivíduos) em relação a armadilha de Falcão (1171 indivíduos). TEODORO *et al.* (1994), no município Querência do Norte, encontraram diferenças estatisticamente significativas nas coletas efetuadas com isca humana e armadilha de Falcão, capturando maior número de espécimes com o primeiro método. TEODORO *et al.* (1995) realizaram capturas de culicídeos com armadilha Shannon e isca humana no lago Itaupu, município Guaíra, região Noroeste do Estado. Do total de culicídeos obtidos, 22.290 (95,5%) foram coletados com armadilha Shannon.

Algumas das espécies identificadas já foram mencionadas por vários autores no Estado do Paraná. BARBOSA *et al.* (1993), no município de Terra Boa, identificaram 30 espécies de culicídeos, com apenas 6 delas, *Chagasia fajardoi*, *Aedes scapularis*, *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1926, *Culex (Culex) coronator* Dyar & Knab, 1906, *Culex (Culex) mollis* Dyar & Knab, 1906 e *Coquillettidia venezuelensis*, representando 61,1% dos 4722 espécimes

coletados. CONSOLIM *et al.* (1993) fizeram um levantamento de espécies de culicídeos de interesse em medicina, no município Foz de Iguaçu. Entre as principais espécies, destacaram-se *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926, *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis*, *Aedes scapularis*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex coronator*, *Culex declarator*, *Psorophora ferox*, *Mansonia titillans*, *Coquillettidia venezuelensis* e *Haemagogous leucocelaenus*. TEODORO *et al.* (1994), numa área no município Querência do Norte, profundamente alterada pela ação do homem, constataram 32 espécies de mosquitos, das quais 7, *Aedes scapularis*, *Anopheles albitarsis*, *Aedeomyia squamipennis*, *Psorophora varipes*, *Coquillettidia (Rhynchotaenia) lynchi* Shannon, 1931, *Mansonia titillans* e *Coquillettidia venezuelensis*, representaram 67,6% do conjunto de mosquitos coletados. TEODORO *et al.* (1995) no município Guaíra, identificaram 41 espécies de mosquitos, sendo as mais abundantes *Coquillettidia (Rhynchotaenia) shannoni* Lane & Antunes, 1973, *Mansonia (Mansonia) humeralis* (Dyar & Knab, 1919), *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922), *Anopheles albitarsis* e *Aedes scapularis*. LOPES & LOZOVEI (1995) realizaram coletas de larvas de culicídeos ao longo do leito do ribeirão, região Norte do Estado, encontrando algumas das espécies citadas neste trabalho: *Culex (Culex) bidens* Dyar, 1922, *Culex mollis*, *Culex grupo coronator*, *Culex (Melanoconion) sp*, *Aedeomyia squamipennis*. Posteriormente, estes autores fizeram capturas de culicídeos adultos na mesma localidade, e encontraram diferenças nas abundâncias das espécies para cada época do ano. *Anopheles* foi o gênero predominante contribuindo com 74,1% do total de espécimes coletados. As espécies deste

gênero foram coletadas principalmente na época de primavera. *Culex (Melanoconion) sp*, *Culex (Culex) quinquefasciatus*, *Culex (Culex) coronator* e *Coquillettidia venezuelensis*, foram coletadas em abundância entre os meses de dezembro a março, ou seja, na época de verão (LOPES & LOZOVEI, 1996).

Neste trabalho, as espécies *Aedes scapularis*, *Culex grupo coronator* e *Culex (Culex) bidens/mollis/nigrus*, foram coletadas nos locais modificados pelo homem, corroborando as observações feitas por BARBOSA *et al.* (1993), CONSOLIM *et al.* (1993), TEODORO *et al.* (1994), TEODORO *et al.* (1995) e LOPES & LOZOVEI (1996), sobre a possível adaptação dessas espécies aos ambientes antropogênicos, demonstrando acentuada antropofilia.

Na Reserva Florestal Foz de Iguaçu, foram coletadas em maior abundância espécies de culicídeos silvestres. Na fazenda Rio Butu foi obtido um resultado similar, provavelmente porque o capão onde foram efetuadas as capturas de mosquitos, apesar de ser freqüentado por animais domésticos, era também visitado por diferentes espécies de aves, abarcava uma área extensa, estava afastado das áreas domiciliares e possuía uma vegetação densa e diversa.

Espécies citadas na bibliografia como vetores de vírus causadores de encefalomielite, bunyavírus e outros arbovírus de importância médica e veterinária, foram coletadas. Entre elas estão: *Culex (Culex) coronator*, *Culex (Culex) declarator*, *Culex (Melanoconion) sp*, *Aedes aegypti*, *Aedes serratus*,

*Aedes scapularis*, *Psorophora sp*, *Sabethes sp*, *Wyeomyia sp*, *Limatus durhami*, *Mansonia titillans*, *Coquillettidia venezuelensis* (CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1994; BERAN, 1994; FIELDS *et al*, 1996).

*Culex (Culex) coronator* e *Culex (Culex) declarator* são freqüentes em ambientes peridomiciliares e estão envolvidos na transmissão do vírus SLE e outros arbovirus causadores de encefalomyelites (HERVÉ *et al.*, 1986; CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1994; OLIVEIRA, 1994).

*Culex (Melanoconion) sp* é reconhecido como vetor dos vírus EEE e VEE. Segundo FORATTINI, *et al.* (1989), diferentes espécies de *Culex (Melanoconion) sp* são coletadas em abundância em áreas peridomiciliares (alteradas e com atividade agropecuária), usando isca humana e aspiradores. No entanto, nas áreas estudadas a sua densidade no horário crepuscular e o rendimento de coleta com esse método foram baixos (5 indivíduos). Provavelmente, fatores de tipo ambiental, influenciaram na atividade de hematofagia desta espécie.

*Aedes aegypti* foi coletada no sítio Novo Oeste, num local próximo das áreas domiciliares. Esta espécie é o único vetor conhecido da febre amarela urbana no Brasil, e o atual transmissor da dengue em diferentes regiões do país (CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1994).

*Aedes serratus*, coletada no município Querência do Norte, é freqüente em matas secundárias, tem maior atividade no crepúsculo e apresenta

preferência por mamíferos grandes. Esta espécie tem um importante papel na transmissão de arbovírus (HERVÉ *et al.*, 1986).

*Aedes scapularis* é uma espécie que vem mostrando acentuada antropofilia nos municípios de Foz de Iguaçu, São Miguel do Iguaçu, Santa Helena, Guaíra, Querência do Norte, Santo Inácio, Centenário do Sul e Porecatu (Estado do Paraná) (TEODORO *et al.*, 1995). Esta espécie, pela sua domiciliação, tem sido colocada como possível veiculador de agentes infecciosos. CAUSEY *et al.* (1961) isolaram o vírus MAG, cepa BeAR 7272, de um pool de mosquitos que continha a espécie *Aedes scapularis*, entre outras. Durante a epidemia acontecida em 1975-6 no sudeste de São Paulo esta espécie foi considerada como suspeita de transmitir o vírus da encefalite Rocio, mas não foi achado naturalmente infectada o mesmo (FORATTINI *et al.* 1978; CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1994). Em condições experimentais, tem-se mostrado vetor do vírus da febre amarela, mas não foi ainda comprovado (CONSOLIM *et al.*, 1993).

As espécies do gênero *Psorophora* foram coletadas no município Querência do Norte, nos locais alagados onde pastavam os animais que adoeceram. A espécie *Psorophora ferox*, tem sido encontrada naturalmente infectada com os vírus VEE, SLE, ILH, MAY e ROC em diferentes localidades da América do Sul (FORATTINI, 1965a; LOPES *et al.*, 1981; HERVÉ *et al.*, 1986).

*Sabethes chloropterus* é uma espécie de grande importância médica. É considerada vetor potencial do vírus da febre amarela silvestre e no Brasil, foi encontrada naturalmente infectada pelos vírus SLE e ILH (FORATTINI, 1965b).

As espécies dos gêneros *Wyeomyia* e *Limatus* foram coletadas em abundância na Reserva Florestal Foz de Iguaçu, ou seja, numa localidade pouco alterada pelo homem. Alguns isolamentos de arbovírus já foram obtidos nessas espécies (HERVÉ *et al.*, 1986; CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1994).

*Mansonia titillans* é tido como vetor suspeito na veiculação do vírus VEE no Equador, Brasil e Trinidad. Na Venezuela tem sido encontrado naturalmente infectado com este vírus (CONSOLIM *et al.*, 1993; CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1994; FIELDS *et al.*, 1996).

*Coquillettidia venezuelensis* tem sido encontrado naturalmente infectado por arbovírus (HERVÉ *et al.*, 1986).

No presente trabalho, apesar de terem sido coletadas espécies de culicídeos de importância médica e veterinária, não foi possível isolar vírus. Três possíveis razões são atribuídas a este fato:

1- a quantidade de mosquitos coletada foi pequena. Grandes quantidades são recomendadas para garantir ou aumentar a probabilidade de isolar o vírus, considerando que nem todas as espécies, nem todos os indivíduos estarão contaminados por vírus (CEPANZO, 1982; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992).



LOPES & LOZOVEI (1996) demonstraram que as espécies dos gêneros *Culex* (*Culex*), *Culex* (*Melanoconion*), *Psorophora*, *Mansonia*, *Coquillettidia* e *Aedes*, reconhecidas como vetores de arbovírus, são capturadas em maior abundância na época de verão. No entanto, a baixa abundância de culicídeos nas áreas estudadas não corrobora os resultados obtidos no trabalho acima mencionado;

2- o tempo de coleta foi curto e limitado à época de verão do ano 1997, devido a restrição de tempo para realização do curso de mestrado. A maioria das pesquisas virológicas com culicídeos é efetuada por um período mais extenso, tendo em vista a existência de fatores físicos, biológicos e outros, que podem interferir no estudo. Segundo CONSOLI, 1994; FIELDS *et al.*, 1996 e TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1996, existem fatores de tipo biológico/ecológico que podem influenciar o ciclo natural de transmissão do vírus como, por exemplo, estado imune e nutricional do hospedeiro, variações sazonais e ciclo de atividade das populações hospedeiras, interação vírus - célula hospedeira, entre outros;

3- as áreas de estudo foram selecionadas considerando os casos de eqüinos suspeitos para encefalomielite. No entanto, devido a limitação de tempo para efetuar o trabalho, não foi possível realizar testes virológicos e sorológicos, em animais sentinelas, que permitissem definir melhor as áreas de interesse.

Apesar de não ter obtido isolamento de vírus a partir dos mosquitos coletados, os testes sorológicos efetuados com os soros dos eqüinos

revelaram a presença de anticorpos para arbovírus de interesse epidemiológico. O teste de neutralização, além de esclarecer as reações cruzadas obtidas entre os vírus EEE, PIX e MUC, revelou a presença de anticorpos N para o vírus EEE nas 12 amostras testadas, podendo deduzir que este vírus ocorreu nos municípios de Querência do Norte e de Colorado. No entanto, pela falta de uma segunda amostragem de soros e, por não obter isolamento de vírus a partir das amostras de sangue, não foi possível saber se se tratava de uma infecção recente ou passada.

O teste de IH revelou também a presença de anticorpos para os vírus MAG, ILH e SLE. Pelas razões colocadas acima, não foi possível saber se a infecção nos animais era recente ou passada.

Os vírus ILH e SLE são *Flavivirus* transmitidos por mosquitos. O vírus ILH foi isolado pela primeira vez no Brasil, em pool de mosquitos das espécies *Aedes sp* e *Psorophora sp* (KARABATSOS, 1985). No Brasil, já foi isolado em eqüinos sem produzir patogênese neles (KARABATSOS, 1985; IVERSSON *et al*, 1993). O vírus SLE é transmitido no Brasil pelas espécies *Culex (Culex) declarator* e *Culex (Culex) coronator*. As aves são os hospedeiros primários, mas o vírus SLE pode afetar o homem e os eqüinos quando epizoótico, sem produzir conseqüências clínicas aparentes ou conhecidas (BERAN & STEELE, 1994; FIELDS *et al*, 1996).

O vírus MAG é um *Bunyavirus* que pertence ao serogrupo Bunyamwera. Foi isolado pela primeira vez de um pool de mosquitos das espécies *Aedes scapularis*, *Aedes serratus*, *Aedes (Howardina) sexlineatus* (Theobald, 1901), *Mansonia sp* e *Psorophora ferox*, coletados no Brasil em 1957 (CAUSEY *et al*, 1961; KARABATSOS, 1985; CALISHER *et al*, 1987). A presença de anticorpos IH foi observada em humanos, cavalos e aves, mas os sintomas que produz em eqüinos e humanos não são conhecidos (SABATTINI *et al*, 1965; KARABATSOS, 1985; IVERSSON *et al*, 1993).

No Brasil e outras regiões do Continente Americano foi demonstrado, através de inquéritos sorológicos e isolamentos de arbovírus, a importância das aves silvestres na dispersão dos vírus causadores de encefalomielite e na manutenção do ciclo enzoótico destes. Em todas as pesquisas realizadas foi revelada uma grande riqueza e diversidade de espécies de aves com anticorpos para os vírus EEE, WEE, VEE, ILH, ROC, SLE e TCM (BIGLER *et al*, 1976; MCLEAN *et al*, 1985; VASCONCELOS *et al*, 1991; DÉGALLIER *et al*, 1992; IVERSSON *et al*, 1993; IVERSSON, 1994; FERREIRA *et al*, 1994).

O Estado do Paraná, entre outros Estados do Brasil e países da América Latina, está dentro do roteiro migratório de aves silvestres, residentes e migratórias, que constituem reservatórios naturais de vírus causadores de encefalomielite. IVERSSON *et al*. (1993), numa região do Pantanal Brasileiro, acharam evidências de infecção recente nos eqüinos pelo vírus EEE e, colocaram a hipótese de que esta região podia ser um importante foco de manutenção e de introdução do vírus, em regiões próximas.

Neste trabalho não foi avaliada a presença de anticorpos em animais silvestres, mas pela capacidade migratória de muitas espécies de aves, pela presença de anticorpos para o vírus EEE nas aves, considerando que os vírus SLE, ILH e MAG não produzem conseqüências clínicas conhecidas e que os eqüinos nos municípios Querência do Norte e de Colorado apresentaram sintomas de encefalomielite, é possível levantar a hipótese de que o vírus EEE foi provavelmente o agente causador da doença nesses animais. No entanto, é preciso fazer estudos virológicos e sorológicos mais prolongados com o objetivo de confirmar a origem da morbidade dos eqüinos nas regiões estudadas no Estado do Paraná.

## 6. CONCLUSÕES

1- Nas localidades de estudo: sítio Novo Oeste, fazenda Rio Butu, Reserva Florestal Foz de Iguaçu e município Querência do Norte, foram coletadas 32 espécies de mosquitos, sendo as mais abundantes *Culex (Culex) grupo coronator*, *Culex (Culex) bidens/molliis/nigrus*, *Culex (Culex) declarator*, *Aedes scapularis*, *Aedes serratus*, *Sabethes intermedius*, *Sabethes sp*, *Wyeomyia sp*, *Trichoprosopon pallidoventer* e *Psorophora sp*. Algumas das espécies citadas são consideradas vetores de vírus causadores de encefalomielite, bunyavírus e outras arboviroses de importância epidemiológica.

2- Apesar de terem sido coletados culicídeos reconhecidos como vetores de arbovírus de importância epidemiológica, não foi possível isolar vírus. Três possíveis razões são atribuídas a este resultado:

- a) pequenas quantidades de mosquitos foram coletadas;
- b) o tempo de coleta foi limitado e;
- c) não foram efetuados testes virológicos e sorológicos em animais sentinelas, que permitissem definir melhor as áreas de estudo, nas regiões de interesse.

3- Nas amostras de sangue colhidas nos municípios Querência do Norte e de Colorado não houve isolamento de vírus. No entanto, apresentaram anticorpos IH para pelo menos um dos seguintes arbovírus EEE, MUC,

PIX, SLE, ILH e MAG. As reações cruzadas entre os vírus EEE, MUC e PIX foram esclarecidas pelo teste de neutralização, revelando a presença de anticorpos N para o vírus EEE.

4- Pela presença de sintomas de encefalomielite e de anticorpos para o vírus EEE nos soros dos eqüinos, e pela existência de uma grande riqueza de espécies de aves silvestres migratórias, com anticorpos para este vírus, no Estado do Paraná, supõe-se que o vírus EEE possa ser o agente causador da doença nos eqüinos, nas regiões estudadas.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1- REATIVOS E SOLUÇÕES.

#### 1) Solução utilizada no macerado de mosquitos:

Albumina bovina a 0,75% em PBS.....	1000,00 ml
Penicilina.....	5.000.000 u
Estreptomicina.....	1,00 g

A penicilina foi dissolvida em 50 ml de água destilada e a estreptomicina foi dissolvida em 10 ml de água destilada. Dois mililitros de cada uma foram adicionadas na solução de albumina.

#### 2) Soluções utilizadas no teste de inibição da hemaglutinação (IH):

##### a) Albumina bovina a 0,75% em PBS:

Fosfato monobásico de potásio( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....	13,60 g
Fosfato dibásico de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).....	2,00 g

Foram dissolvidos separadamente em 100 ml de água desmineralizada. 10 ml de cada uma dessas soluções foram adicionados a 980 ml de água desmineralizada, contendo 7,0 g de NaCl. A seguir, dissolveu-se 7,5 g de albumina de plasma bovino cristalizado (fração V) nessa solução tamponada. A solução de albumina foi filtrada.

##### b) Ácido - citrato - dextrose (ACD):

Ácido cítrico ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).....	4,00 g
Citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) .....	11,26 g
Dextrose .....	11,00 g

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p..... 500,00 ml

Autoclavado a 10 libras por 10 minutos.

c) Dextrose - gelatina - veronal (DGV):

Dextrose ..... 10,00 g

Salina veronal 5x concentrada..... 200,00 ml

Gelatina..... 0,60 g

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p..... 1000,00 ml

A gelatina foi dissolvida em 300 ml de água quente. Esta solução foi combinada com outros reagentes e depois autoclavada por 10 minutos a 10 libras de pressão.

d) Soluções estoque A, B, C, D, E:

d.1) Solução A (1,5 M de Cloreto de sódio):

Cloreto de sódio (NaCl) ..... 87,65 g

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p ..... 1000,00 ml

d.2) Solução B (0,5 M de Ácido bórico):

Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) ..... 30,92 g

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada quente..... 700,00 ml

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p ..... 1000,00 ml

d.3) Solução C (Hidróxido de sódio concentrado, 18N):

Hidróxido de sódio (NaOH)..... 500,00 g



H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p ..... 500,00 ml

d.4) Solução D (0,5 M de Fosfato dibásico de sódio):

Fosfato dibásico de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, anidro)..... 70,99 g

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p ..... 1000,00 ml

d.5) Solução E (1,0 M de Fosfato monobásico de sódio):

Fosfato monobásico de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O)..... 138,01 g

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p ..... 1000,00 ml.

e) Solução tamponada de borato salina pH 9,0:

Solução A ..... 80,00 ml

Solução B ..... 100,00 ml

Solução C(diluída 1:18 em água destilada)..... 24,00 ml

H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p ..... 1000,00 ml

f) Albumina bovina (Fração V) 4% em pH 9,0:

Albumina bovina (Fração V)..... 4,00 g

Borato salina pH 9,0 q.s.p. .... 100,00 ml

g) Albumina bovina 0,4% em pH 9,0:

Albumina bovina 4% em pH 9,0..... 100,00 ml

Borato salina pH 9,0 ..... 900,00 ml.

h) Sucrose a 8,5%:

Sacarose.....	8,50 g
H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p.....	100,00 ml

i) Solução para pH 6,0:

Solução A .....	100,00 ml
Solução D.....	32,00 ml
Solução E.....	184,00 ml
H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p.....	1000,00 ml

A solução foi armazenada no refrigerador a 4 °C.

j) Solução para pH 7,0:

Solução A .....	100,00 ml
Solução D.....	240,00 ml
Solução E.....	80,00 ml
H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p .....	1000,00 ml

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

k) Preparação de hemácias de ganso:

O ganso doméstico (*Anser cinereus*) adulto, branco e macho é o animal de escolha. Este foi sangrado na veia da asa com uma seringa que continha 1,5 ml de ACD, sendo o volume final 8,5 ml. A seguir o sangue foi centrifugado 15 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e os glóbulos foram lavados quatro vezes em DGV (um volume de glóbulos e três volumes de DGV). Após as lavagens, as hemácias foram suspensas 1:5 em

DGV.

Para uso na adsorção de aglutininas os glóbulos foram lavados três vezes em NaCl 0,85%, e suspensos 1:6 nessa solução.

**3) Temperaturas e pHs usados para cada antígeno, no teste de IH:**

ANTÍGENO	TEMPERATURA ( ° C)	pH
EEE	37	6,2
WEE	37	6,2
MUC	37	6,2
PIX	37	6,2
SLE	37	6,8
ILH	37	6,4
MAG	37	6,1
TCM	37	6,1
CAR	*T.A	6,0
CATU	T.A	6,0

\* T.A= temperatura ambiente.

**4) Solução usada no teste de Neutralização:**

Albumina bovina a 0,75% em PBS: ver fórmula acima.

**ANEXO 2- ESQUEMA DE NEUTRALIZAÇÃO USADO PARA O VÍRUS EEE.**

<b>DILUIÇÕES DO VÍRUS</b>										
<b>SORO</b>	<b>- 1</b>	<b>- 2</b>	<b>- 3</b>	<b>- 4</b>	<b>- 5</b>	<b>- 6</b>	<b>- 7</b>	<b>- 8</b>	<b>- 9</b>	<b>- 10</b>
<b>1°AB*</b>							<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>AN</b> <b>7526**</b>		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>						
<b>4/11***</b>					<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>6/11</b>						<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>1/11</b>							<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	
<b>2°AB*</b>							<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

**\* Titulação do vírus EEE.**

**\*\* Soro Homólogo**

**\*\*\* Número de soros testados/número total de soros.**

**OBS:** As diluições do vírus testadas para cada soro foram estabelecidas de acordo com o título de IH obtido.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ACHA, P. & SZYFRESM, B.** Encefalitis equina venezolana In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. **Publicación Científica No. 354 O.M.S., O.P.S.** Washington D.C. 1977 p.708.
2. **ALICE, F.J.** Encefalomielite eqüina na Bahía: estudo de três amostras isoladas. **Rev. Bras. Biol.,** Rio de Janeiro, v. 11, p. 125-144, 1951.
3. **BARBOSA, O.C.; TEODORO, U; LOZOVEI, A.L.; LA SALVIA FILHO, V.; SPINOSA, R.P.; DE LIMA, E.M. & COSTA FERREIRA, M.E.M.** Nota sobre culicídeos adultos coletados na região sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública.** v. 27, n. 3, p. 214-216, 1993.
4. **BEER, J.** Doenças infecciosas em animais domésticos. V.1, 1988, p. 457.
5. **BERAN, G.W. & STEELE, J.H.** Handbook of zoonoses. 2<sup>a</sup>. ed. Seção B: Viral. CRC Press. 1994, p. 582.
6. **BIGLER, W.J.; LASSING, E.B.; BUFF, E.E.; PRATHER, E.C.; BECK, E.C. & HOFF, G.L.** Endemic eastern equine encephalomyelitis in Florida: a twenty-year analysis, 1955-1974. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 25, n.6, p. 884-890, 1976.
7. **BRUNO-LOBO, G.; BRUNO-LOBO, M.; TRAVASSOS, J.; PINHEIRO, F. & PAZIN, LP.** Estudos sobre os arbovírus. III. Isolamento de vírus sorologicamente relacionado ao sub-grupo Western - Sindbis de um caso de encefalomielite equina no Rio de Janeiro. **An. Microbiol., IX pt A,** p. 183-195, 1961.

8. **CALISHER, C.H. & MANESS, K.S.C.** Laboratory studies of Venezuelan equine encephalitis virus in equines, Texas, 1971. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.2, p. 198-205, 1975.
  
9. **CALISHER C.H.; KINNEY, R.M.; DE SOUZA LOPES, O.; TRENT, D.W.; MONATH, T.P. & FRANCY, D.B.** Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 31, n. 6, p. 1260-1272, 1982.
  
10. **CALISHER, C.H.; GUTIERREZ, E.; FRANCY, D.E.; ALAVA, A.; MUTH, D. & LAZUICK, J.** Identification of hitherto unrecognized arboviruses from Ecuador: Members of serogroups B, C, Bunyamwera, Patois, and Minatitlan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.32, n.4, p. 877-885, 1983.
  
11. **CALISHER, C.H.; MONATH, T.P.; SABATTINI, M.S.; MITCHELL, C.J.; LAZUICK, J.S.; TESH, R.B. & CROPP, C.B.** A newly recognized vesiculovirus, calchaqui virus, and subtypes of Melao and Maguari viruses from Argentina, with serologic evidence for infections of humans and horses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.36, n.1, p. 114-119, 1987.
  
12. **CARNEIRO, V.** A encephalomyelitis infecciosa dos equinos no Brasil. **Arch. Inst. Biol. S. Paulo**, n.8, p. 115-134, 1937.
  
13. **CAUSEY O.R.; CAUSEY, C.E.; MAROJA, O.M. & MACEDO, D.G.** The isolation of arthropod-borne viruses including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 10, p. 227-249, 1961.
  
14. **CAUSEY, O.R.; SHOPE, R.E.; SUTMOLLER, P. & LAEMMERT, H.** Epizootic eastern equine encephalitis in the Bragança region of Pará, Brazil. **Rev. Serv. Esp. Saúde Púb.**, Rio de Janeiro, v.12, n.1, p. 39-45, 1962.

15. **CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. CEPANZO.** Recolección y procesamiento de artrópodos de importancia médica. Buenos Aires, Argentina. No. 2, 1982, p. 32.
16. **CHAMBERLAIN, R.W. & SUDIA, W.D.** Recolección y procesamiento de artrópodos de importancia médica para aislamiento de arbovirus. **Centro Panamericano de Zoonosis, O.P.S. y O.M.S.** No. 2, 1975. p.32.
17. **CLARKE D.H. & CASALS, J.** Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 7, p. 561-573. 1958.
18. **CONSOLI, R.G.B. & DE OLIVEIRA, R.L.** Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Ed. Fiocruz, 1994, p. 225.
19. **CONSOLIM, J.; PELLEGRINI, N.J.M. & LUZ, E.** Culicídeos (Diptera, Culicidae) do Lago Itaipú, Paraná, Brasil. I. Município de Foz de Iguaçu. **Acta Biol. Par.** n. 22, p. 83-90, 1993.
20. **CORRÊA, W.A. & CORRÊA, C.M.** Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª. ed. MEDSI, 1992, p. 843.
21. **CRANS, W.J. & SCHULZE, T.L.** Evidence incriminating *Coquillettidia perturbans* (Diptera: Culicidae) as an epizootic vector of eastern equine encephalitis. I. Isolation of EEE virus from *C. perturbans* during an epizootic among horses in New Jersey. **Bull. Soc. Vect. Ecol.**, Santa Ana, v. 11, n.1, p. 178-184, 1986.
22. **CUNHA, R.** Verificação de anticorpos para o vírus Este da encefalomielite equina em soros de cavalos do nordeste brasileiro. **Rev. Bras. Biol.**, São Paulo, v. 3, p. 425-430, 1943.

23. CUPP E.W.; SCHERER, W.F. & ORDONEZ, J.V. Transmission of Venezuelan encephalitis virus by naturally infected *Culex (Melanoconion) opisthopus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 28, n. 6, p. 1060-1063, 1979.
24. CUPP E.W.; SCHERER, W.F.; LOK, J.B.; BRENNER, R.J.; DZIEM, G.M. & ORDONEZ, J.V. Entomological studies at an enzootic Venezuelan equine encephalitis virus focus in Guatemala, 1977-1980. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 35, n. 4, p. 851-859, 1985.
25. DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; DA SILVA, J.M.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; DA SILVA, G.P. & DA SILVA, R.P. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia brasileira. *Boll. Mus. Para. Emílio Goeldi, ser. Zool.*, v.8, n.1, p. 69-111, 1992.
26. FERREIRA I.B.; PEREIRA, L.E.; ROCCO, I.M.; MARTI, A.T.; DE SOUZA, L.T.M. & IVERSSON, L.B. Surveillance of arbovirus infections in the atlantic forest region, state of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo.* v. 36, n. 3, p. 265-274, 1994.
27. FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. & HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. 3ª. edição. V.1, 1996, p. 1504.
28. FORATTINI, O.P. *Entomologia Médica*. São Paulo, ed. USP, 1962, v.1.
29. ————— *Entomologia Médica*. São Paulo, ed. USP, 1965a, v.2.
30. ————— *Entomologia Médica*. São Paulo, ed. USP, 1965b, v.3.
31. FORATTINI, O.P.; GOMES, A.C.; GALATI, E.A.B.; RABELLO, E.X. & IVERSSON, L.B. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no Sistema



da Serra do Mar, Brasil. 1. Observações no ambiente extradomiciliar. **Rev. Saúde Públ. São Paulo**, v. 12, p. 297-325, 1978.

- 32. FORATTINI, O.P.; GOMES, A.C.; NATAL, D.; KAKITANI, I. & MARUCCI, D.** Preferências alimentares e domiciliação de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, com especial referência a *Aedes scapularis* e a *Culex (Melanoconion)*. **Rev. Saúde Pública, São Paulo**. v. 23, n.1, p. 9-19, 1989.
- 33. FORATTINI, O.P.; GOMES, A.C.; SANTOS, J.F.L.; KAKITANI, I. & MARUCCI, D.** Frequência ao ambiente humano e dispersão de mosquitos Culicidae em área adjacente a Mata Atlântica primitiva da Planície. **Rev. Saúde Pública, São Paulo**. v. 24, n. 2, p. 101-107, 1990.
- 34. FORATTINI, O.P.** Ecologia, epidemiologia e sociedade. Artes Médicas: Editora da Universidade de São Paulo, 1992, p. 529.
- 35. —————** Culicidologia Médica. Princípios gerais, morfologia, glossário taxonômico. Ed. USP, V. 1, 1996, p. 548.
- 36. FORATTINI, O.P. & SALLUM, M.A.M.** Manual de laboratório de taxonomia: Biologia e identificação de mosquitos de interesse em saúde pública. Núcleo de pesquisas taxonômica e sistemática em entomologia médica (NUPTM). Faculdade de Saúde Pública, USP, 1997.
- 37. FOTHERGILL, L.R.; DINGLE, J.H.; FARBER, S. & CONNERLY, M.** Human encephalitis caused by the virus of eastern variety of equine encephalomyelitis. **New England Jour. Med.**, n.219, p. 411, 1938.
- 38. GRESIKOVA, M; SEKEYOVA, M.; MARTÍNEZ, A.F. & ALVAREZ, M.H.** Eastern equine encephalomyelitis virus strains isolated in Cuba. **Acta virológica**. v. 27, n.3, p. 286, 1983.

- 39. HERVÉ, J.P.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.;**  
**PINHEIRO, F.P. & SÁ FILHO, G.C.** Arboviroses – Aspectos ecológico.  
In: Instituto Evandro Chagas- 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Fund. Serv. Saúde Pública, Belém. V.1, 1986, p. 529.
- 40. HOWITT, B.** Recovery of the virus of equine encephalomyelitis from the brains of a child. *Science* n. 89, p. 455-456, 1938.
- 41. IVERSSON, L.B.** Epidemia de encefalite por arbovírus na região Sul do Estado de São Paulo, Brasil, em 1975 e 1976. Aspectos da distribuição cronológica e geográfica dos casos. *Rev. Saúde Públ., São Paulo*, v. 11, p. 375-388, 1977
- 42. -----**Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico sobre arbovírus patogênicos para o homem na região da Mata Atlântica do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v. 36, n. 4, p. 343-353, 1994.
- 43. IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. & TRAVASSOS DA ROSA, J.P. J.P.** Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. II- Inquérito em pacientes do Hospital regional de Pariqueira - Açú. *Rev. Saúde Pública, São Paulo*. v. 15, p. 587-602, 1981.
- 44. IVERSSON, L.B.; SILVA, M.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. & BARROS, R.S.V.** Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. *Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo*. v. 35, n.4, p. 355-359, 1993.

45. **KARABATSOS, N., ed.** International catalogue of arboviruses. Including certain other viruses of vertebrates. 3<sup>a</sup>. edition. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio Texas, 1985.
46. **KUBES, V. & RIOS, F.A.** The causative agent of infectious encephalomyelitis in Venezuela. *Science*, Washington, v.90, p. 20-21, 1939.
47. **LANE, J.** Neotropical Culicidae. São Paulo, ed. USP, 1953a, v.1.
48. ————— Neotropical Culicidae. São Paulo, ed. USP, 1953b, v.2.
49. **LEAKE, C.J.** Arbovirus-mosquito interactions and vector specificity. *Parasitology Today*. v. 8, n. 4, p. 123- 128, 1992.
50. **LETSON, G.W.; BAILEY, R.E.; PEARSON, J. & TSAI, T.F.** Eastern equine encephalitis (EEE): A description of the 1989 outbreak, recent epidemiologic trends, and the association of rainfall with EEE occurrence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 49, n. 6, p. 677-685, 1993.
51. **LOPES, O.S. & SACHETTA, L.A.** Estudos epidemiológicos sobre o vírus EEE no Leste de São Paulo. *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. n. 16, p. 253-258, 1974.
52. **LOPES J. & LOZOVEI, A.** Ecologia de mosquitos (Diptera:Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. I- Coletas ao longo do leito de ribeirão. *Rev. Saúde Pública*. v.29, n. 3, p. 183-190, 1995.
53. —————. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Paraná, Brasil. II- Coletas com isca humana. *Revta. Bras. Zool.* v. 13, n. 3, p. 585-596, 1996.

54. **LOPES, O.S.; SACCHETTA, L.A.; FRANCY, D.B.; JAKOB, W.L. & CALISHER, C.H.** Emergency of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio virus from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). **Amer. J. Epidem.** V. 113, p. 122-125, 1981.
55. **MAACK, R.** Geografia do Estado do Paraná. 2<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro, J. Olympio, 1981.
56. **MATTOS, I.G.** Contribuição ao estudo das Arboviroses na Guanabara. Rio de Janeiro, 1970. Dissertação (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
57. **MATTOS, I.G.; ANDRADE, C.M.; SOUZA, M.M. & BRUNO-LOBO, M.** Estudos sobre os arbovirus: Inquérito sorológico realizado no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** V. 17, n.6, p. 330-337, 1975.
58. **MCLEAN, R.G.; FRIER, G.; PARHAM, G.L.; FRANCY, D.B.; MONATH, T.P.; CAMPOS, E.G.; THERRIEN, A.; KERSCHNER, J. & CALISHER, C.H.** Investigations of the vertebrate hosts of eastern equine encephalitis during an epizootic in michigan, 1980. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.34, p. 1190-1202, 1985.
59. **MEYER, K.F.; HARING, C.M. & HOWITT, B.** The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquim Valley. **Science** n.74, p. 227-228, 1931.
60. **MITCHELL C.J.; T.P. MONATH; M.S. SABATTINI; C.B. CROPP; J.F. DAFFNER; C.H. CALISHER; W.L. JAKOB & H.A. CHRISTENSEN.** Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980: II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 34, n. 5, p. 945-955, 1985.

61. MITCHELL, C.J.; T.P. MONATH; M.S. SABATINI; J.F. DAFFNER; C.B. CROPP; C.H. CALISHER; R.F. DARSIE & W.L. JAKOB. Arbovirus isolation from mosquitoes collected during and after the 1982-1983 epizootic of western equine encephalitis in Argentina. **Am. J. Trop. Med Hyg.** v. 36, n.1, p. 107-113, 1987.
62. MITCHELL C.J.; NIEBYLSKI, M.L.; SMITH, G.C.; KARABATSOS, N.; MARTIN, D.; MUTEBI, J.P.; CRAIG Jr, G.B. & MAHLER, M.J. Isolation of Eastern equine encephalitis virus from *Aedes albopictus* in Florida. **Science.** v. 257, p.526-527, 1992.
63. MONATH T.P. The arboviruses: Epidemiology and Ecology. CRC Press, Inc. v. IV, 1988, p. 203-231.
64. NATAL, D.; MARUCCI, D.; DOS REIS, I.M. & GALATI, E.A.B. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotômíneos (Diptera). **Revta. Bras. Ent.** v. 35, n. 4, p. 697-700, 1991.
65. NILSON, M.R. & SUGAY, W. Ocorrência da encefalomielite eqüina em Itaporanga, Estado de São Paulo. I. Isolamento e identificação do vírus. **Arq. Inst. Biol.** , São Paulo, v. 29, p. 63-68, 1962.
66. OLIVEIRA, L.H. Virología Humana. Ed. Cultura Médica. Rio de Janeiro. 1994, p. 341.
67. PETERS, J.C. & J.M. DALRYMPLE. Alphaviruses. In: Virology. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven Press, 1990. p. 713-761.
68. RICHARTZ, R.R.T. Detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação para *Alphavirus* em soros de eqüinos do Estado do Paraná. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Setor de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

69. **SABATTINI, M.S.; SHOPE, R.E. & VANELLA, J.M.** Serological survey for arboviroses in Cordoba Province, Argentina. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.14, p. 1073-1078, 1965.
70. **SCHERER W.F.; CUPP, E.W.; LOK, J.B.; BRENNER, R.J. & ORDONEZ, J.V.** Intestinal threshold of an enzootic strain of Venezuelan encephalitis virus in *Culex (Melanoconion) taeniopus* mosquitoes and its implications to vector competency and vertebrate amplifying hosts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 30, n. 4, p. 862-869, 1981.
71. **SERVICE, M.W.** Mosquito Ecology. Field sampling methods: sampling adults with carbon dioxide traps, light-traps, visual attraction traps and sound traps. Chapman & Hall, 2ª. edição, 1993, p. 499-610.
72. **SHANNON, R.** Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. **Am. J. Trop. Med.** n. 19, p. 131-140, 1939
73. **SHERER, W.F.; WEAVER, S.C.; TAYLOR, C.A.; CUPP, E.W.; DICKERMAN, R.W. & RUBINO, H.H.** Vector competence of *Culex (Melanoconion) taeniopus* for allopatric and epizootic Venezuelan equine encephalomyelitis viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 30, n.1 p. 194-197, 1987.
74. **SHOPE R.E.; CAUSEY, O.R.; PAES DE ANDRADE, A.H. & THEILER, M.** The Venezuelan equine encephalomyelitis complex of group A arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 13, p. 723-727, 1964.
75. **SHOPE, R.E. & SATHER, G.E.** Arboviruses. In: LENNETTE, E.H.; N.J. SCHMIDT. Diagnostic procedure for viral, rickettsial and chlamydial

infections. 5. Ed. Washington: American Public Health Association, 1979, p. 767-814.

76. **SICK, H.** Migrações de aves no Brasil. **Brasil Florestal.** v. 9, n. 39, p. 7-10, 1979.
77. **SOLLERS-RIEDEL, H.** Literature references to mosquitoes and mosquito-borne diseases, 1981. Part. III. **Mosq. News.** v.41, n.3, p. 602-623, 1981.
78. **SOUZA-LOPES & SACCHETTA, L.A.** Isolation of Mucambo virus, a member of the Venezuelan equine encephalitis virus complex in the state of São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 20, n. 2, p. 82-86, 1978.
79. **TEN BROECK, C. & MERRIL, M.H.** Serological differences between eastern and western equine encephalomyelitis virus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** Baltimore, v. 31, p. 217-220, 1933.
80. **TEODORO U.; GUILHERME, A.L.F.; LOZOVEI, A.L.; LA SALVIA FILHO, V.; SAMPAIO, A.A.; SPINOSA, R.P.; FERREIRA, M.E.M.C.; BARBOSA, O.C. & DE LIMA, E.M.** Mosquitos de ambientes peri e extradomiciliares na região sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública.** v. 28, n. 2, p. 107-115, 1994.
81. **TEODORO, U.; GUILHERME, A. L. F.; LOZOVEI, A. L.; FILHO, V.; FUKUSHIGUE, Y.; SPINOSA, R. P.; FERREIRA, M.E.M.C.; BARBOSA, O. C. & DE LIMA, E. M.** Culicídeos do lago de Itaipu, no rio Paraná, Sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública,** v. 29, n.1, p. 6-14, 1995.
82. **TRAVASSOS, J.; BRUNO-LOBO, M. & BRUNO-LOBO, G.G.** Estudos sobre arbovírus. V. Inquérito sorológico e avaliação da imunidade pós-vacinal em eqüinos no Rio de Janeiro. **An. Microbiol. (Rio de J.),** v.9, p. 213-228, 1961.

- 83. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; RODRIGUES, S.G. & TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.** Manual de procedimentos técnicos para coleta de amostra e diagnóstico laboratorial da encefalomyelites eqüinas. Belém: Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, Instituto Evandro Chagas, 1992, p. 57.
- 84. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F.P. & VASCONCELOS, P.F.C.** Arboviroses. Em: doenças infecciosas e parasitárias. Enfoque Amazônico. Ed. CEJUP. 1996. p. 207-225.
- 85. TURELL M.J.; LUDWIG, G.V. & BEAMAN, J.R.** Transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by *Aedes sollicitans* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) **J. Med. Entomol.** v. 29, n. 1, p. 62-65, 1992.
- 86. TURELL M.J.** Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes taeniorhynchus* for Rift valley fever and Venezuelan equine encephalitis viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 49, n. 6, p. 672-676, 1993.
- 87. VASCONCELOS P.F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F.P. & SÁ FILHO, G.C.** Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia Brasileira. **Rev.Inst. Med. trop. São Paulo.** v. 33, n. 6, p. 465-476, 1991.
- 88. WALDER R.; SUAREZ, O.M. & CALISHER, C.H.** Arbovirus studies in southwestern Venezuela during 1973-1981: II. Isolations and further studies of Venezuelan and Eastern equine encephalitis, Una, Itaqui, and Moju viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 33, n. 3, p. 483-491, 1984a.



- 89.------. Arbovirus studies in the Guajira region of Venezuela: activities of Eastern equine encephalitis and Venezuelan equine encephalitis viruses during an interepizootic period. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 33, n. 4, p. 699-707, 1984.
90. **WALTON, T.E.; HOLBROOK, F.R.; BOLIVAR-RAYA, R.; FERRER-ROMERO, J. & ORTEGA, M.D.** Venezuelan equine encephalomyelitis and African horse sickness. **Annals New York Academy of Sciences.** p. 217-227, 1992.
91. **WEAVER, S.C.; SCHERER, W.F.; CUPP, E.W. & CASTELLO, D.A.** Barriers to dissemination of Venezuelan encephalitis viruses in the middle american enzootic vector mosquito, *Culex (Melanoconion) taeniopus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 33, n. 5, p. 953-960, 1984.
92. **WEAVER, S.C.; SHERER, W.F.; TAYLOR, C.A.; CASTELLO, D.A. & CUPP, E.W.** Laboratory vector competence of *Culex (Melanoconion) cedecei* for sympatric and allopatric Venezuelan equine encephalomyelitis viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.35, n.3, p. 619- 623, 1986.
93. **WEAVER, S.C.** Recurrent emergence of Venezuelan Equine Encephalomyelitis. In: *Emerging Infections*. Ed. Scheld, W.M.; Armstrong, D. & Hughes J.M. ASM Press, Washington, D.C. Cap. 3, 1998, p. 27-42.
94. **WEBSTER, L.T. & WRIGHT, F.H.** Recovery of eastern equine encephalomyelitis virus from brain tissue of human cases of encephalitis in Massachussetts. **Science** n. 88, p. 305-306, 1938.
95. **WHITE, D.O. & FENNER, F.J.** *Medical virology*. Academic Press. 4ta. Edição, 1994, p. 603.
96. **WHO.** *Viral Hemorrhagic Fevers*. Technical Report, 719. Geneva. 1985, p. 126.

97. **WIGG, M.D.** Isolamento de uma amostra de vírus WEE em *Haemagogous janthinomys* . Rio de Janeiro, 1977. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.