

B10-12

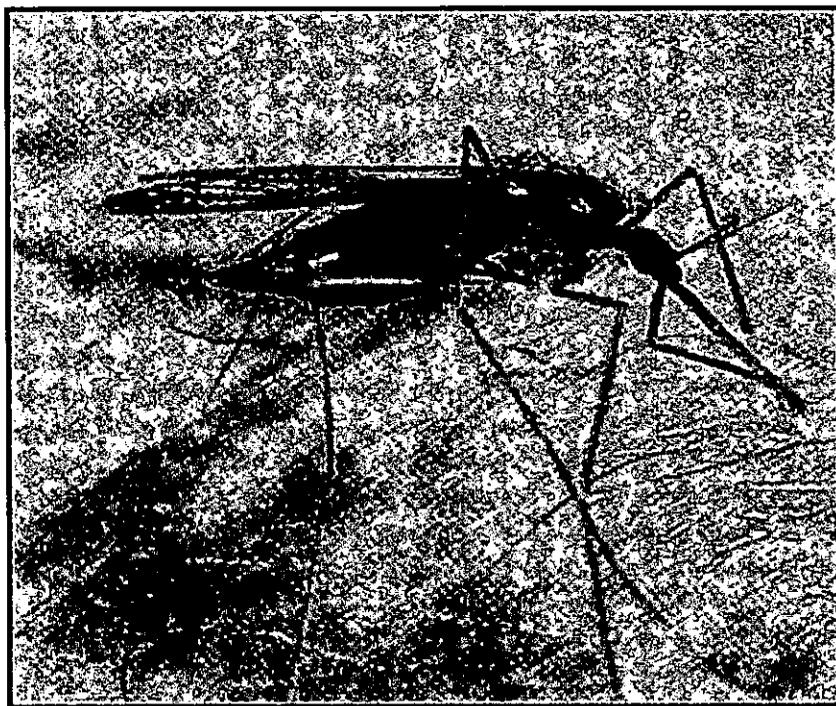
R. E. 68B



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

TRABALHO DE LICENCIATURA

Aplicação de uma Técnica de Biologia Molecular para
a Identificação do Complexo *An. gambiae* a Sul de
Moçambique



AUTORA : IVONE E. RUNGO

MAPUTO, JUNHO DE 1999

**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

TRABALHO DE LICENCIATURA

**TÍTULO:
APLICAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA A
IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO *Anopheles gambiae* A SUL DE
MOÇAMBIQUE**

Supervisores:

dr. Nelson Cuamba

dr. Bernardo Muatinte

Maputo, junho de 1999



AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos aos supervisores dr. Nelson Cuamba e dr. Bernardo Muatinte que orientaram e apoiaram durante a planificação e na realização deste trabalho.

O autor expressa o seu agradecimento ao Instituto Nacional de Saúde pela permissão e apoio no trabalho.

Ao dr. Almeida Luis pelas sugestões e críticas na redacção do relatório.

A minha gratidão é expressa a todos os trabalhadores do laboratório de entomologia Médica do INS pela colaboração desinteressada.

Agradecer ao Instituto Nacional de Investigação agronómica, pelos dados fornecidos.

Aos meus familiares, a todos os amigos e colegas que moralmente me apoiaram principalmente nos períodos da realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao financiamento concedido pelo projecto DEIBI e GTZ .

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Ivone Ernesto Rungo, autora do trabalho, "Aplicação de uma técnica de biologia molecular para a identificação do complexo *Anopheles gambiae* na região sul de Moçambique", declaro que este foi realizado por mim, com auxílio dos meus supervisores, no Departamento de Parasitologia de sangue do Instituto Nacional de Saúde, Maputo.

Ivone Ernesto Rungo

Maputo, Junho de 1999

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Cidália Quadros, pelo apoio moral e paciência concedidos durante os anos de estudo.

Abreviaturas e glossário:

AR- *An. arabiensis*

bp- pares de bases

Conspécifico- Organismos da mesma espécie

dATP- trifosfato 2' desoxiadenosina

dCTP- 5' trifosfato 2' desoxicitidina

dNTP- trifosfato 2' desoxirribonucleico

dTTP- 5' trifosfato 2' desoxitimidina

EDTA- ácido diamino tetracético

Electroforese- Separação de moléculas num campo eléctrico

GA- Primer específico para *An.gambiae*

GPS- Sistema de posicionamento geográfico

ME- Primer específico para *An. merus*

Nucleotídeo- Uma das unidades (A,T,G,C) das quais são feitas as moléculas de DNA.

PCR-Polymerase Chain Reaction-Amplificação enzimática da sequência de DNA.

Primer-Uma sequência de DNA (oligonucleotídeo) que poderá anelar o DNA alvo para permitir a amplificação do PCR.

Probe-Um comprimento de DNA ou RNA que quando marcado pode ser usado para localizar sequências similares.

QD-Primer do *An. quadriannulatus*

rDNA-Os genes das moléculas do RNA ribossomal que formam a estrutura dos ribossomas

SDS- Sódio dodecil Sulfato

Simpátricas- Onde populações, espécies ou outros taxa ocupam uma única área geográfica.

Taq polimerase- Enzima termóstável do DNA polimerase da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* usada para amplificar o DNA pelo método doPCR

TBE-tampão ácido diamino tetracético tris borato

TE-Tris- ácido diamino tetracético

UN- Primer Universal para a mesma posição do rDNA de todas as cinco espécies.

ÍNDICE

	Pag
Resumo.....	i
Lista de tabelas.....	ii
Lista de figuras.....	iii
1. Introdução.....	1
1.1 Revisão bibliográfica.....	4
2. Objectivos.....	9
2.1 Objectivos princial.....	9
2.2 Objectivos específicos.....	9
3. Material e métodos.....	10
3.1 Área de estudo.....	10
3.1.1 Critério de escolha das áreas.....	10
3.1.2 Boane.....	10
3.1.3 Matutuine.....	11
3.1.4 Chókwe.....	11
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Colheita.....	12
3.2.2 Optimização.....	12
3.2.3 Componentes de reacção.....	19
3.2.4 Composição específica.....	20
3.2.4.1 Electroforese e leitura dos resultados.....	20
3.2.5 Estudo do comportamento alimentar.....	22
3.26 Descrição do habitat das larvas.....	23

3.2.7 Estudo do hábito de repouso.....	23
4- Análise de dados.....	24
5. Resultados.....	24
5.1 Optimizaçodo método de PCR.....	26
5.2 Extracção do DNA.....	28
5.3 Reagentes e soluções para o gel e tampão de electroforese.....	29
5.4 Composição específica.....	33
5.5 Actividade e comportamento alimentar.....	35
5.6 Habitat das larvas.....	36
5.7 Hábitos de repouso.....	37
6. Discussão.....	39
6.1 Optimização.....	39
6.2 Composição específica.....	41
6.3 Actividade e comportamento alimentar.....	42
6.4 Habitat das larvas.....	43
6.5 Hábitos de repouso.....	44
7. Conclusões, recomendações e limitações do trabalho.....	45
8. Referências bibliográficas.....	46
10. Anexos.....	52
11 Anexo1 Mann-Whitney U test.....	53
12 Anexo2 Mapa do distrito de Boane.....	54
13 Anexo 3 Mapa do distrito de Matutuine.....	55
14 Anexo 4 Mapa do distrito de Chókwe.....	56

RESUMO

Uma técnica de "rDNA-PCR" foi pela primeira vez introduzida e otimizada para as condições de Moçambique. Esta técnica foi usada para o estudo da composição específica de mosquitos colhidos em três regiões a Sul de Moçambique; nomeadamente Boane, Chókwe e Matutuine, em 1998. A técnica, foi ainda, usada para estudos detalhados do comportamento alimentar, hábito de repouso e habitat larval do mesmo complexo na região de Boane. Esta técnica uma vez mais constitui um instrumento adicional em estudos de epidemiologia de malária bem como no controle dos vectores de doença.

Usando promotores específicos que amplificam regiões de espaços intergénicos (IGS) do rDNA, 851 espécimes de larvas e mosquitos adultos foram identificados.

Em Boane duas espécies do complexo foram encontradas simpátricas *Anopheles merus* e *Anopheles arabiensis*. Contudo o *An. merus* foi a espécie mais abundante e compreendeu 81.4% do total de espécimes. Entretanto, nos distritos de Matutuine e Chókwe o *An. arabiensis* foi a única espécie encontrada.

O *An. merus* foi encontrado alimentando-se dentro e fora de casa. Porém, as proporções de *An. merus* picando fora foram significativamente maiores que os espécimes picando no interior das habitações.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência de "primers" do diagnóstico de espécies dos membros de <i>An. gambiae</i> e o tamanho dos produtos de PCR esperados.....	22
Tabela 2- Números totais de mosquitos do complexo <i>A. gambiae</i> identificados nas três regiões estudadas.....	25
Tabela 3- Comparação de quantidades de reagentes usados entre o PCR standard e o PCR otimizado no presente estudo.....	28
Tabela 4- Quantidades de reagentes necessários para o gel de 1.2% de concentração.....	30
Tabela 5- Composição específica do complexo <i>An. gambiae</i> em três regiões do Sul de Moçambique durante o período de estudo.....	34
Tabela 6- Espécie de larvas colhidas e identificadas nas três regiões de estudo.....	38
Tabela 7-Número total de mosquitos e respectivas percentagens de <i>A. arabiensis</i> e <i>A. merus</i> colhidos com o uso de diferentes métodos.....	39

Lista de figuras

Figura 1- Evolução mensal da precipitação e temperatura média em Boane durante os 6 meses antes do e durante a realização estudo.....24

Figura 2- Bandas de DNA produzidas pela amplificação de rDNA-PCR do DNA de *An. arabiensis* e *An. merus*.....31

Figura 3- Bandas de DNA produzidas por amplificação de rDNA-PCR do DNA de *An. arabiensis* e *An. Merus*.....32

Figura 4- Actividade alimentar de *An. merus* dentro e fora das habitações nos bairros do distrito de Boane.....33

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos do complexo *Anopheles gambiae* são os principais vectores de malária na África Sub-Sahariana (Donnelly *et al.*, 1998). Estes mosquitos estão também envolvidos na transmissão da filaríase e doenças arbovirais (White, 1974).

O complexo *An. gambiae* é actualmente um grupo de sete espécies de mosquitos (Hunt *et al.*, 1998), morfologicamente indistinguíveis cuja genética, comportamento, preferência alimentar e exigência reprodutiva são também distintos o que faz variar a sua importância como vectores da malária em África (Gillies e De Meillon, 1968; Gillies e Coetzee, 1987 e Colluzi *et al.*, 1979).

Enquanto três e possivelmente quatro espécies podem ser simpátricas em algumas regiões, pelo menos duas ou três ocorrem em muitas áreas endémicas da malária (Scott *et al.*, 1993). Por exemplo na Gâmbia (Bryan, 1979) e na Tanzania (Mnzava e Kilama, 1986) observaram, na maioria das localidades, que pelo menos duas espécies do complexo coexistiam de forma simpátrica. Em Moçambique, as espécies deste complexo foram encontradas também coexistindo em muitas localidades (Petrarca *et al.*, 1984; Cuamba *et al.*, 1996).

O mais compreensivo trabalho feito sobre a distribuição do complexo *An. gambiae* em Moçambique data dos anos 80 (Petrarca *et al.*, 1984). Os autores, usando métodos citogenéticos, encontraram o *An. arabiensis* largamente espalhado pelo país, o *An. gambiae* apenas no Centro e Norte, o *An. merus* confinado às regiões costeiras e o *An. quadriannulatus* encontrado apenas numa única ocasião a Sul da província de Maputo. Os autores observaram, ainda, que na maioria das regiões pelo menos duas espécies se encontravam de forma simpátrica. Mais recentemente usando os mesmos métodos Cuamba *et al.*, (1996), encontraram nos arredores da cidade de Maputo o *An. merus* e o *An. arabiensis* coexistindo simpatricamente e nos arredores da cidade de Xai-Xai *An. quadriannulatus* e *An. arabiensis* também simpátricos. Contudo, em nenhum dos trabalhos

acima mencionados estes autores estudaram aspectos ecológicos relevantes para uma planificação racional de controle dos vectores; tais como o comportamento alimentar, os hábitos de repouso e de reprodução.

Os únicos trabalhos sobre a ecologia das larvas do complexo *An. gambiae* em Moçambique foram realizados por De Meillon (1941) e Cuamba (1992). Contudo, os autores não identificaram os espécimes encontrados a nível específico.

Os conhecimentos actuais sobre os aspectos epidemiológicos da transmissão da malária são baseados numa extensa literatura, mas intensamente comprometida pelo facto de que as espécies reportadas como sendo, o *An. gambiae sensu lato*, serem às vezes uma mistura de pelo menos dois membros deste complexo (Scott *et al.*, 1993).

Porque duas ou mais espécies podem ocorrer na mesma região, casa ou criadouro, a sua identificação é de particular importância para estudos epidemiológicos bem como para o seu controle de malária. Por exemplo, no distrito de Boane foram registados 2446 casos dos 6058 diagnosticados durante o período de estudo.

Vários métodos para a identificação dos membros do complexo a nível de espécie tem sido desenvolvidos. Estes incluem as análises citogenéticas (Colluzi e Sabatini 1967, 1968, 1969) e o diagnóstico isoenzimático (Mahon *et al.* 1976; Miles 1978, 1979). Os métodos mais recentes baseam-se nas diferenças a nível do DNA para identificar as espécies dentro do complexo *An. gambiae*, incluindo aquela que usa a técnica da "Polimerase Chain Reaction" (PCR) (Paskewitz e Collins, 1990 e Scott *et al.*, 1993).

Todos os organismos possuem genes que contêm ácido desoxiribonucleico (DNA). Algumas sequências de pares de bases do DNA genómico que caracterizam a dupla hélice da fita de DNA, são únicas para uma espécie particular. E se estes podem ser isolados do respectivo organismo e detectados, com certeza isto mostra que é um método seguro para o diagnóstico das espécies (Gilles, 1993).

A técnica do PCR é vantajosa, em relação a outros métodos porque é compatível a vários métodos de preservação da amostra, é eficaz no diagnóstico de todos os estágios de mosquitos, e necessita apenas de pequenas porções do corpo que pode ser inclusive parte de uma pata. Assim, o PCR permite que o resto do corpo do mosquito seja usado para outros testes, tais como a origem da refeição sanguínea, presença do parasita, testes de resistência/susceptibilidade à insecticidas. Contudo, o PCR não é uma técnica sem dificuldades; os custos dos reagentes e equipamentos são elevados (Paskewitz *et al.*, 1993, Collins *et al.*, 1987). As condições de reacção, de amplificação e a origem dos reagentes variam de laboratório para laboratório daí a necessidade de optimização do PCR em particular de enzima de polimerização, dos "Primers" e do Cloreto de Magnésio, de tal modo que se usem quantidades mínimas de reagentes mas ainda suficientes de produzir resultados consistentes (Innis e Gelfand, 1990).

Este trabalho, teve como primeiro objectivo a optimização de uma técnica de "PCR" para a identificação de mosquitos membros do complexo *An. gambiae*. E em segundo lugar, o trabalho teve como objectivo fornecer uma composição actualizada dos membros do complexo *An. gambiae*, bem como alguns parâmetros ecológicos destas espécies em algumas regiões do Sul de Moçambique.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O complexo *An.gambiae*, ecologia e sua relação com a transmissão de outras doenças

Três espécies do complexo *An. gambiae* estão adaptadas a reproduzir-se em locais de água doce; são elas: *An. gambiae s.s.*, *An.arabiensis* e *An. quadriannulatus* conhecidas anteriormente por espécies A, B e C respectivamente (White, 1974).

O *An. gambiae s.s* predomina em zonas de floresta e savana húmida, é altamente endofílica e antropofágica, e é um importante vector da malária (White, 1974; Gillies e Coetzee; 1987). O *An. arabiensis* que se encontra maioritariamente nas savanas é em muitas áreas zoofílico e exofílico, mas contudo, é um eficiente vector da malária (Service, 1993). Em contraste, *An. quadriannulatus* é zoofílico e, conseqüentemente, não está envolvido na transmissão de agentes patogénicos ao Homem (White, 1974 ; Gillies e Coetzee, 1987 e Service, 1993).

Duas espécies do complexo *An. gambiae* reproduzem-se em águas salgadas; o *An. melas* no Oeste de África e o *An. merus* no Este de África. Estas espécies são vectores locais da malária, mas eles pelo facto de serem geralmente mais exofágicos e zoofílicos são assim pobres vectores em comparação a *An. gambiae s.s.* (Service, 1993). Embora o *An. merus* seja incriminado como vector secundário da malária ele é considerado um importante vector de transmissão de *Wuchereria bancrofti* (nemátodo responsável pela filariase no Homem). (White, 1974; Lehane, 1987; Gilles e Coetzee, 1987).

As larvas do *An. merus* são encontradas, geralmente, nos charcos costeiros dos mangais, poças salgadas, charcos salobres (Gillies e De Meillon, 1968) ou em fontes minerais (Muspratt e Henning, 1983 citado por Coetzee e Le Seur 1988).

Os lugares mais abundantes de reprodução de *An. melas* surgem entre ervas marinhas e mangais (Muirhead-Thomson, 1945; 1948; Chwatt, 1945 citados por White, 1974).

O membro mais novo do complexo, ainda não totalmente descrito e portanto sem nome formal, foi descoberto na Etiópia e designado *An. quadriannulatus* espécie B (Hunt *et al.*, 1998).

Todos os parasitas da malária humana são transmitidos pelos mosquitos fêmeas do género *Anopheles* (Gillies e Coetzee, 1987). Segundo a literatura disponível, o *An. gambiae* e o *An. arabiensis* são também considerados vectores extremamente eficientes dos parasitas de *Wuchereria bancrofti*, em África (Gillies e Coetzee, 1987).

Os membros do complexo *An. gambiae* são também implicados na transmissão de viroses ao Homem; como por exemplo na transmissão do vírus do O'nyong-nyong no Este de África (White, 1974), Chikungunya. (Bres *et al.*, 1969), Ngando-group (Lee e Moore, 1972), Tataguine (Rickenbach *et al.*, 1976, Ota *et al.*, 1976), Sindbis (Johnson *et al.*, 1977), Germinsston (Prince, 1972).

CICLO DE VIDA DE *Anopheles gambiae*

O ciclo de vida dos Anofelinos varia maioritariamente com a temperatura. O tempo mínimo para o ovo tornar-se adulto pode variar entre 10-12 dias no laboratório. O estágio do ovo dura entre um e dois dias, a larva entre sete e oito dias, e a pupa entre um e dois dias. Nas fêmeas o tempo de emergência para a refeição hemática (a fase pré grávida) dura de um a dois dias e a maturação tem lugar durante este período. Da primeira refeição hemática á ovipostura (o primeiro ciclo gonotrófico) são cerca de dois a quatro dias, dependendo da temperatura. Assim o ciclo completo dura no mínimo cerca de duas semanas.

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO *Anopheles gambiae*

Desde a descoberta do complexo *A.gambiae* vários métodos de identificação foram sendo investigados.

a) Teste de hibridização

Este envolve a criação da progénie de fêmeas parentais selvagens e o cruzamento destas com estirpes do laboratório de identidade conhecida para determinar com que membros do complexo elas podem ser interférteis e portanto conspecíficos (Gillies e Coetzee, 1987).

b) Métodos morfológicos

Os testes de hibridização consomem muito tempo e nem todos os laboratórios possuem insectários. Assim, houve a necessidade de explorar as características morfológicas tais como: bandas nos palpos, sensilas coelocónicas e basicónicas nas antenas, marcas nas asas, bandas nas patas, diâmetro da espermateca, pupa e larva somente em espécies do complexo *An. gambiae*. Contudo, estas diferenças não são muito seguras para a identificação dos membros deste complexo pois, só é possível identificar espécies da água doce da salgada, e mesmo assim estas características podem variar de região para região (Gillies e Coetzee, 1987).

c) Métodos fisiológicos

A tolerância fisiológica da água salgada pelas larvas de *An. melas* e *An. merus* é a base dum valioso teste idealizado por (Ribbands, 1944b; Muirheard-Thomson, 1951a citado por White, 1974) para distinguir as espécies *An. gambiae s.l.* da água salgada das espécies da água doce. Um teste similar baseado em solutos minerais pode ser desenvolvido para identificar a *Anopheles bwambae* (espécie D). O uso de larvas vivas para o teste é complicado e deveras ineficiente pois, só uma única espécie sobrevive durante o teste (espécie da água salgada) (White, 1974).

d) Métodos citogenéticos

Os procedimentos fisiológicos são muito laborosos. A identificação diferencial das três espécies da água doce depende completamente dos métodos citogenéticos (White, 1974).

A diferenciação citotaxonómica das espécies similares pode ser levada a cabo em apenas fêmeas semi-grávidas (ovários ocupando entre o quarto e o quinto segmento ventralmente e o sexto dorsalmente) e larvas do quarto estágio larval através da leitura das sequências de bandas dos cromossomas politenos que exibem inversões características da espécie (Coluzzi e Sabatini, 1967; 1968a; 1968b; 1969 Green, 1972; Davidson e Hunt, 1973 citado por White 1974).

A aplicação deste teste apenas em fêmeas pré-grávidas e larvas do quarto estágio constituem uma dificuldade adicional.

e) Métodos bioquímicos

Os métodos bioquímicos tem sido desenvolvidos para a separação das espécies similares através das diferenças dos pigmentos de pteridina nos olhos (Micks et al., 1966; 1967 Citado por Gillies e Coetzee 1987) ou proteína dos ovos (Ross, 1968 citado por Gillies e Coetzee 1987). Contudo, estes métodos não são muito claros ou práticos para a aplicação dum único espécimen (White, 1974).

A electroforese tem sido executada para a identificação dos membros do complexo *An. gambiae* (Mahon et al., 1976; Miles, 1979). O diagnóstico das enzimas neste complexo tem a vantagem de concentrar-se no tórax, deste modo, o abdomen e a cabeça podem ser removidos e examinados para oocistos e esporozoitos. O tórax pode ser dissecado para o exame de microfilárias e então o resto do corpo submetido à electroforese para a identificação do mosquito (Miles, 1979). Esta técnica de identificação é superior ao método cromossómico pois permite que todos os adultos, quer sejam machos quer sejam fêmeas, em diferentes estágios do ciclo gonotrófico, sejam identificados (Mahon et al., 1976). Contudo, constitui desvantagem o facto de que a técnica só pode ser aplicada em mosquitos vivos e material congelado fresco (Collins et al., 1987; Coluzzi, 1992)

5- Princípios do PCR

A técnica de "Polimerase Chain Reaction" (PCR) consiste na produção de múltiplas cópias de segmentos de DNA ou (RNA) determinados por sequências oligonucleotídicas flanqueadoras desses segmentos (Sambrook *et al.*, 1989). Em traços gerais, a técnica consiste em reunir condições *in vitro* para a síntese de cópias do segmento pretendido, através da acção de uma enzima DNA polimerase. Para tal, uma reacção de PCR deve incluir os seguintes componentes:

- Sequências oligonucleotídicas flanqueadoras e promotoras do segmento a amplificar, ou primers.
- "DNA template", no qual está inserido o segmento que se pretende amplificar.
- Unidades nucleotídicas livres ou dNTP's
- Enzima DNA-polimerase.
- Tampão de PCR, que proporcionará as condições óptimas de pH e co-factores necessários ao funcionamento da enzima e desenrolar da reacção.

A reacção ocorre num termociclador cuja função é proporcionar um conjunto de ciclos repetidos de aquecimento/arrefecimento que levam a uma reacção em cadeia e à síntese exponencial de um elevado número de cópias do segmento a ser amplificado. Calcula-se que após 20 ciclos, existam mais de 10^6 cópias sintetizadas do segmento.

2- OBJECTIVOS

2.1- Objectivo principal:

Com este trabalho, pretendeu-se introduzir pela primeira vez no país e otimizar para as condições de Moçambique, uma técnica de "rDNA-PCR" para a identificação de mosquitos membros do complexo *Anopheles gambiae* em Moçambique.

2.2- Objectivos específicos:

- Otimizar uma técnica de PCR para a identificação de mosquitos membros do complexo *An. gambiae*.
- Estudar a composição específica dentro do complexo *An. gambiae* em três distritos a sul de Moçambique.
- Estudar o comportamento alimentar dos membros do complexo *An. gambiae* no distrito de Boane.
- Estudar o habitat preferido das larvas do complexo *An. gambiae* no distrito de Boane.
- Estudar o hábito de repouso dos membros do complexo *An. gambiae* nos três distritos.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Área de estudo

O estudo foi realizado em três distritos do País, nomeadamente o distrito de Matutuine (Salamanga) e distrito de Boane (Bairro 2,5,7) na província de Maputo e distrito de Chókwe (Barragem de Macarretane) na província de Gaza (Figura em anexo).

O distrito de Boane foi escolhido para estudos mais detalhados de ecologia de *An. gambiae*.

3.1.1-Critérios de escolha das áreas

Um dos estudos mais recentes sobre a composição de espécies do complexo *Anopheles gambiae* em Boane mostrou a presença simpátrica de *An. arabiensis* e *An. merus* (Cuamba, 1996). Contudo o autor, não forneceu dados sobre a frequência alimentar e de repouso. Assim, Boane foi escolhido para estudos mais detalhados do complexo *An. gambiae* devido a sua proximidade com Maputo, onde se situa o laboratório de Entomologia Médica do Instituto Nacional de Saúde. Em relação ao distrito de Chókwe, o programa de Malária do Ministério de Saúde tem planificado o controle de malária através da introdução de redes mosquiteiras. A região de Matutuine está incluída no projecto de desenvolvimento económico e turístico, que inclui além de Moçambique, a Suazilândia e África do Sul. O controle de vectores de malária constitui uma prioridade dentro deste projecto. Contudo, não existe informação sobre a composição específica dos vectores de malária que ocorrem nestas duas áreas.

3.1.2- Boane

A vila de Boane, a cerca de 30km da cidade de Maputo, situa-se a 25°2' S e 39°19' E e a uma altitude média de 59,3m (ver figura 1 em anexo). Ocupa uma superfície de aproximadamente 815km² com cerca de 59000 habitantes (Comissão Nacional do plano,1993).

O clima predominante na região é semi-árido subtropical e subtropical húmido, com verão quente e húmido, inverno fresco, sendo Janeiro o mês mais quente com temperatura máxima média de 27.3°C e Julho o mês mais frio, a temperatura mínima anual e de 9°C; e as temperaturas médias anuais oscilam entre os 18°C e 26°C e a precipitação média anual variando de 729 a 810mm. Os dados metereológicos de seis meses antes e outros durante a realização do estudo (Dados fornecidos pelo Instituto Agrário de Boane).

3.1.3- Matutuine

O distrito de Matutuine é o mais sententrional da província de Maputo, a sul de Moçambique (figura 2 em anexo), com latitude 26° 06'S e longitude 32° 29'E; Este distrito possui cinco postos administrativos de Catembe, Catuane, Machangulo, Zitundo e Bela Vista. O distrito possui um total de dose localidades. O distrito tem uma superfície de 5.403 Km² com cerca de 35.161 habitantes (Censo, 1997), a densidade da população do distrito é de aproximadamente 9 habitantes/ Km². Este faz fronteira com os países vizinhos da África do Sul a Sul e Swazilandia a Oeste (Perfis de Desenvolvimento Distrital, 1997).

3.1.4- Chókwe

Chókwe é um distrito com pouco mais de 372000 habitantes. Situado no centro da província de Gaza (figura 3 em anexo), com longitude 24°N e 26°S e latitude 32°O e 34°E; é delimitado a norte pelo Rio Limpopo. O distrito tem uma superfície de 2600km² e está dividido em três postos administrativos. (Pijenburg *et al*, 1996 citado por Matusse 1996).

3.2- MÉTODOS

Tamanho da amostra

Durante o estudo foi colhido um total de 606 adultos membros do complexo *An. gambiae*, dos quais 406 foram capturados no distrito de Boane, 131 no Chókwe e 69 em Matutuine. Destes 606 indivíduos capturados foram identificados 482, sendo 313 de Boane, 109 em Chókwe e 60 em Matutuine.

Todos os métodos usados na captura de mosquitos adultos e de larvas são abaixo mencionados e descritos em detalhes (Service, 1976)

3.2.1- COLHEITA

3.2.2-OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PCR:

O objectivo da optimização é de elaborar um protocolo onde se usam quantidades mínimas de reagentes mas com produção de resultados ainda consistentes.

As amostras de membros do complexo *An. gambiae s.l.*, colhidos no campo foram usadas para a optimização das reacções de amplificação do PCR. A especificidade do ensaio foi testada usando duas amostras de duas estirpes de *An. arabiensis* da colónia do insectário do Instituto Nacional de Saúde (INS); Uma proveniente da África do Sul (MRC-Durban) e outra originária de Matutuine e ainda amostras da província de Nampula onde abunda *An. gambiae*.

O DNA extraído dos mosquitos foi isolado usando o método descrito por Collins *et al* (1987).

Foram feitas duas otimizações de reagentes.

1ª otimização:

Foram usados promotores e dNTPs da Boehringer Mannheim, tampão de PCR e Taq DNA polimerase da Stratagene, marcador de DNA da Pharmacia Biotech, $MgCl_2$ e a água destilada foram produzidos e purificados no Instituto Nacional de Saúde. As reacções de amplificação foram feitas num total de 25 μ l e amplificadas num termociclador Hybaid Omnigene .

Os reagentes a otimizar foram:

1- Quantidade e fonte de DNA tamplate do mosquito (pata ou DNA extraído).

2- Concentração do $MgCl_2$

3- Unidades de Taq polimerase.

4- Concentração dos primers do PCR

Os reagentes a otimizar foram submetidos a um programa de reacção standard com a seguinte sequência:

Desnaturação: 94°C durante 30 segundos,

Anneling: 50°C durante 30 segundos

Polimerização: 72°C durante 30 segundos

Estes processos foram repetidos automaticamente durante 30 ciclos ao que se seguiu uma extensão final a 72^o C durante 7 minutos.

2^a optimização:

Os reagentes da primeira optimização esgotaram-se antes de se terminar com o processamento das amostras. Assim, teve que se adquirir outros de uma outra companhia, pelo que houve a necessidade de se fazer a segunda optimização.

O Cloreto de Magnésio, a enzima Taq DNA polimerase e tampão foram fornecidos pela Boehringer Mannheim, a água pura pela Sigma; dNTP's e primers pela Pharmacia Biotech e o marcador de DNA pela GIBCO-BRL. As condições de amplificação do DNA foram as mesmas da primeira optimização.

a) Conservação do material para técnicas de PCR

O fundamental para qualquer técnica de PCR é a conservação do material de estudo antes de se proceder a extracção do DNA. A deterioração do material biológico implica a destruição do seu DNA e o conseqüente aumento da dificuldade de amplificação.

Diversos métodos de conservação tem sido utilizados, entre os quais distinguem-se o uso de etanol e isopropanol a 70%, 80%, 95%, e percentagem absoluta; solução de carnoy; o material pode também ser preservado seco em sílica gel, a temperatura ambiente, congelado, ou em Nitrogénio líquido.

De um modo geral, e para insectos adultos, a conservação em tubos individuais preenchidos com sílica gel e algodão tem sido a mais recomendada. Os insectos imaturos (larvas) recomenda-se o uso de etanol á baixa concentração (o etanol é inibidor do PCR), geralmente 75%.

b) Extração do DNA

Dado que a técnica foi concebida para ser aplicada usando quantidades muito pequenas de DNA, é imprescindível realçar que a qualidade do ácido nucleico extraído é mais importante do que a quantidade.

O DNA dos mosquitos foi extraído usando o método descrito por Collins *et al.*, (1987). Este método é rápido e permitiu, deste modo, a extração e isolamento do DNA no mesmo dia.

Descrição do método

Os mosquitos foram homogeneizados com uma vareta pontiaguda num tubo de eppendorf de 1.5 ml contendo 50 μ l de tampão de lise (80mM NaCl, 160mM de sacarose, 60mM EDTA pH 8.0, 0.5%w/v SDS e 100mM Tris-HCl pH 8.6). A suspensão de células é incubada a 65°C durante 30 min, seguida de uma microcentrifugação durante 15 min a 13500 rpm. O sobrenadante é removido para um tubo de ensaio e são adicionados 100 μ l de álcool a 95% congelado para precipitar o DNA e novamente centrifugado num período de 15min a mesma rotação. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol a 70%. O precipitado foi exposto ao ar a secar durante 1 hora, e ressuspendido em 200 μ l de tampão de enzima a pH 8.0 (10mM de Tris-HCl e 1mM EDTA) e armazenado a 4°C.

c) Mistura de reacção

A mistura de reacção é composta pelos elementos da reacção de amplificação: Um tampão que confere um pH ideal para o funcionamento da enzima (pH=8), bem como co-factores enzimáticos como o magnésio; bases nucleotídicas (dNTP's); primers ou promotores da amplificação, enzima DNA-polimerase (geralmente AmpliTaq DNA polimerase) e, finalmente o "DNA template". A mistura é geralmente efectuada para um volume total de 20 ou 25 μ l embora, em condições de optimização, nomeadamente para diagnóstico de PCR um volume de 10 μ l seja utilizado. Assim, para um volume de 25 μ l adoptado neste trabalho foram usadas as seguintes substâncias e suas concentrações:

1- Tampão de PCR: A concentração geralmente usada é de 10mM. O tampão é adquirido comercialmente a 10X (10 vezes concentrado), o que corresponde a 2.5 μ l.

2- Concentração de Magnésio: É em regra 2mM, mas pode variar dependendo do tipo de primer.

3-Concentração de dNTP's é geralmente de 0.2mM

4- Quantidade dos primer é muito específica para cada reacção de PCR e varia entre 10pg e 100ng conforme as suas características e recomendações do autor.

5- Concentração de Taq DNA-polimerase: A concentração standard é de 0.5U que, se apresenta comercialmente com uma concentração de 5U/ μ \approx 0.1 μ l.

6- Quantidade de " DNA template": Cada técnica deve ser afinada para o uso de menor quantidade de DNA possível pois tal contribuirá para minimizar amplificações inespecíficas. Em diagnóstico de PCR, as diluições podem ser feitas até 1/1000 \approx 5pg/ μ l.

Os volumes para cada reagente são calculados em separado e o volume total é preenchido com água estéril, que deve estar dividida em alíquotas de 1ml (em tubos de 1.5ml) e congelada a -20°C.

d) Condições dos ciclos de temperatura

A amplificação exponencial de DNA pelo PCR é feita através de um conjunto de ciclos constantes e repetidos de temperatura. Estes ciclos são de temperatura de desnaturação do DNA, ligação dos primers aos locais complementares da cadeia e construção do segmento complementar.

A temperatura de desnaturação é geralmente de 94°C (podendo ser em alguns casos de 95°C).

A temperatura de "annealing" está intimamente associada ao tipo de primers e sua composição, a nível da relação entre purinas e pirimidinas. Assim:

Em primers específicos a temperatura de "annealing" depende da temperatura de fusão do primers (Tm), cujo valor teórico se calcula do seguinte modo:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ (Sambrook et al., 1989) onde:}$$

G- número de resíduos de guanina na sequência

C- - » » citosina »

A- - » » Adenina »

T- » » Timina »

O intervalo de variação da temperatura de "annealing" para estes primers é:

$$[10^{\circ}\text{C} - T_m; T_m + 5^{\circ}\text{C}]$$

A Temperatura de extensão é, em regra de 72°C. Em casos muito raros pode ser de 65°C a 67°C, quando o comprimento dos primers é superior a 25 pares de bases (pb).

O período de alongamento não é vital para primers específicos, que amplificam segmentos perfeitamente delimitados. Serve de controle pois utiliza tudo o que não foi incorporado nos ciclos.

Visualização e análise do produto amplificado (electroforese e sequenciação automática)

e) Electroforese em gel agarose

É o método mais utilizado, onde a visualização das bandas obtém-se por incorporação de brometo de etídio no produto amplificado, que é fluorescente quando incidido por luz UV, durante a electroforese. Dependendo do tipo de produto a ser analisado, utilizam-se geis com diferentes concentrações de agarose, geralmente variando entre 0.3 e 2.5%. Quanto maior o produto, menor a concentração de agarose:

- Para visualização de DNA (total): 0.8%

- Para produtos amplificados:

- 0.3%: 1000 - 70000 pb

- 0.5%: 700 - 45000 pb

- 0.8%: 400 - 20000 pb

- 1.0%: 300 - 10000 pb

- 1.2% : 200 - 8000 pb

- 2.0%: 100 - 5000 pb

O tampão utilizado é o TBE, sendo igual para o gel e para a tina de electroforese.

Este deve ser preparado a 5X (5 vezes concentrado), pois assim precipita menos. A concentração de trabalho pode ser de 0.5X, para o gel e para a tina.

O brometo de etídio deve ser incorporado directamente no tampão, que sevirá para o gel e a tina. A concentração que geralmente se usa é de 0.5 µg/ml.

O loading buffer deve ser utilizado a concentração 5X, para Orange G. E utiliza-se 1:5 (20%v/v), para cada amostra. É constituído por Ficoll, EDTA e um corante chamado orange-G. Os dois primeiros componentes aumentam a densidade da amostra e asseguram uma distribuição uniforme de DNA dentro das poças enquanto ao último funciona como um indicador do movimento do DNA no gel durante a electroforese.

O marcador molecular é dependente das dimensões dos produtos amplificados. Para este caso foi usado o marcador da MWM VI, Boheringer-Mannheim com pares de bases variando de 2176 a 154.

A voltagem submetida a um gel de 11 x 8 x 0.4 cm é de 7.3V/cm.

3.2.3- Componentes de reacção.

3.2.3.1- Reagentes e soluções para o PCR

Taq DNA polimerase 0,875 unidades

10x tampão de reacção / Taq DNA polimerase

Jogo de dNTPs Ultra puro (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

100 mM de solução, 4x25 µmol

4x100 µmol

4x500 µmol

Estes dNTPs estavam conservados em tampão contendo: 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1mM EDTA, 5mM DTT (é usado para reduzir ligações dissulfato para análise electroforética de proteínas) , adicionado estabilizadores, e 50% de glicerol.

10x tampão de reacção

Primers específicos (concentrações)

UN e ME 12.5 ng/µl

GA 22 ng/µl

AR 18.75 ng/µl

QD 25 ng/µ

dNTPs

10 mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato; ATP, TTP, GTP e CTP.

MgCl₂ é um co-factor enzimático. A intensidade das bandas amplificadas dependem da quantidade do MgCl₂.

0.25 mM

Tampão de reacção PCR (10x)

Gelatina é incluída para ajudar a estabilizar a enzima, embora muitos protocolos possam fornecer resultados sem adição da proteína.

0.02% de solução foi preparada por dissolução de 5mg de gelatina em 25 ml de água.

0.5 µl do stock da reacção.

Água

A água pura foi conservada em alíquotas em tubos eppendorf estéreis e conservada a -20°C.

Óleo mineral

50µl de óleo mineral foram usadas para cobrir a mistura de reacção.

3.2.4- COMPOSIÇÃO ESPECÍFICA

3.2.4.1-Electroforese e leitura dos resultados

Terminado o PCR 10 µl do volume da reacção foram retirados sob o óleo mineral, misturado com 5 µl dum gel agarose standard contendo o tampão (20% Ficoll em 25mM EDTA pH 8

contendo uma pequena quantidade de orange-G), electroforesado através de 1.2% de gel agarose-Tris-borato-EDTA contendo 1µl de brometo de etídio a 7.3 v/cm e intensidade de 48 mA durante 1 hora (gel: 11x 8 x 0.4 cm) num 1x tampão TBE (0.089M Tris, 0.089M ácido bórico, 0.002 M EDTA em 1 litro de água estéril e 20µl brometo de etídio).

Finda a electroforese os fragmentos amplificados foram visualizados por iluminação de ondas curtas de luz ultravioleta e as imagens captadas através de um filme polaroide. Cada reacção do PCR foi executada com três controis: Um controle negativo com a mistura do PCR sem "DNA template"; Um controle positivo *A. arabiensis* e um *A. merus*.

O PCR diferencia os membros do complexo *An. gambiae* porque usa uma combinação de cinco primers, com sequências derivadas do rRNA, o primeiro primer é uma sequência universal, enquanto que os restantes primers eram específicos para *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus* e *An. merus*. (Paskewitz *et al.* , 1993).

Os comprimentos esperados das sequências de nucleótidos amplificados entre "primers" universais e os "primers" específicos foram lidos usando como referência uma solução de um marcador comercial de peso molecular de 2176-154 pb. A sequência de "primers" e os tamanhos dos produtos esperados são mostrados na tabela 2.

Tabela 1: Sequência de primers do diagnóstico de espécies dos membros de *Anopheles gambiae*, e o tamanho dos produtos de PCR esperados (Scott *et al.*, 1993).

Nome do promotor	Sequência do promotor (5' a 3')	Comprimento (pb)
UN	CTG TGC CCC TTC CTG GAT GT	
GA	CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT	390
ME	TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA	466
AR	AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA	315
QD ¹¹	CAG ACC AAG ATG GTT AGT AT	153

3.2.5-ESTUDO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR.

Para o estudo do comportamento alimentar foram retirados 221 mosquitos dos 313 capturados em Boane. Os mosquitos foram colhidos através da técnica de isca humana dentro e fora das habitações. Um dos colectores ficava posicionado no interior de casa e outro fora de casa (entre 3 a 5 metros da casa) sentados com as pernas expostas até ao joelho (comprimento de cerca de 45 cm) a espera que os mosquitos lhes fossem "picar". Os mosquitos eram colhidos logo depois da "aterragem" e imediatamente antes de começar a picar por um aspirador manual e guardados em copos de papelão coberto por uma rede a qual era fixada por um elástico. Por cada hora usava-se um copo.

Os mosquitos capturados foram transportados no fim da colheita para o laboratório, onde foram mortos por congelamento e identificados morfológicamente (Gillies e Coetzee, 1987) com o uso duma lupa na manhã do dia seguinte e conservados secos em sílica gel coberto de algodão em tubos eppendorf, a espera da identificação específica.

As sessões de captura iniciavam por volta das 19 horas e terminavam às 5 horas. Os colectores eram rendidos por outros dois colectores à meia noite de cada dia de colheita: As colheitas foram realizadas quinzenalmente de Janeiro a Junho de 1998.

3.2.6. DESCRIÇÃO DO HABITAT DAS LARVAS

Em Chókwe, Matuine e Boane as larvas amostradas foram capturadas dos reservatórios de água permanentes e semi-permanentes, totalmente expostos ao sol e os virtualmente expostos ao sol, alguns com e outros sem vegetação. Em todos os casos as larvas foram capturadas com o emprego de uma concha entomologica metálica de sopa.

3.2.7- ESTUDO DO HÁBITO DE REPOUSO.

Para este estudo foram retirados 86 mosquitos do distrito de Boane, 60 de Matuine e 109 do distrito de Chókwe dos 482 anofelinos identificados. Estes foram capturados em repouso nas paredes e tectos das habitações, através de um aspirador manual. Os mosquitos colhidos eram colocados em copos de papel com a abertura superior coberta por uma rede fixada com um elástico e sobre esta era colocado algodão embebido em água para evitar a morte dos mesmos por dissecção antes de chegarem ao laboratório. Os copos foram conservados em caixas isotérmicas e transportados para o laboratório de entomologia do Instituto Nacional de Saúde para o processamento. A conservação obedeceu aos procedimentos descritos anteriormente.

4- ANÁLISE DE DADOS

Para a analisar a existência de diferenças significativa no comportamento alimentar dentro e fora das habitações foi usado o Mann-Whitney U test. Os resultados foram considerados estatisticamente significativa quando o P fosse menor que 0.05 (Fowler *et al.*,1998).

5-RESULTADOS

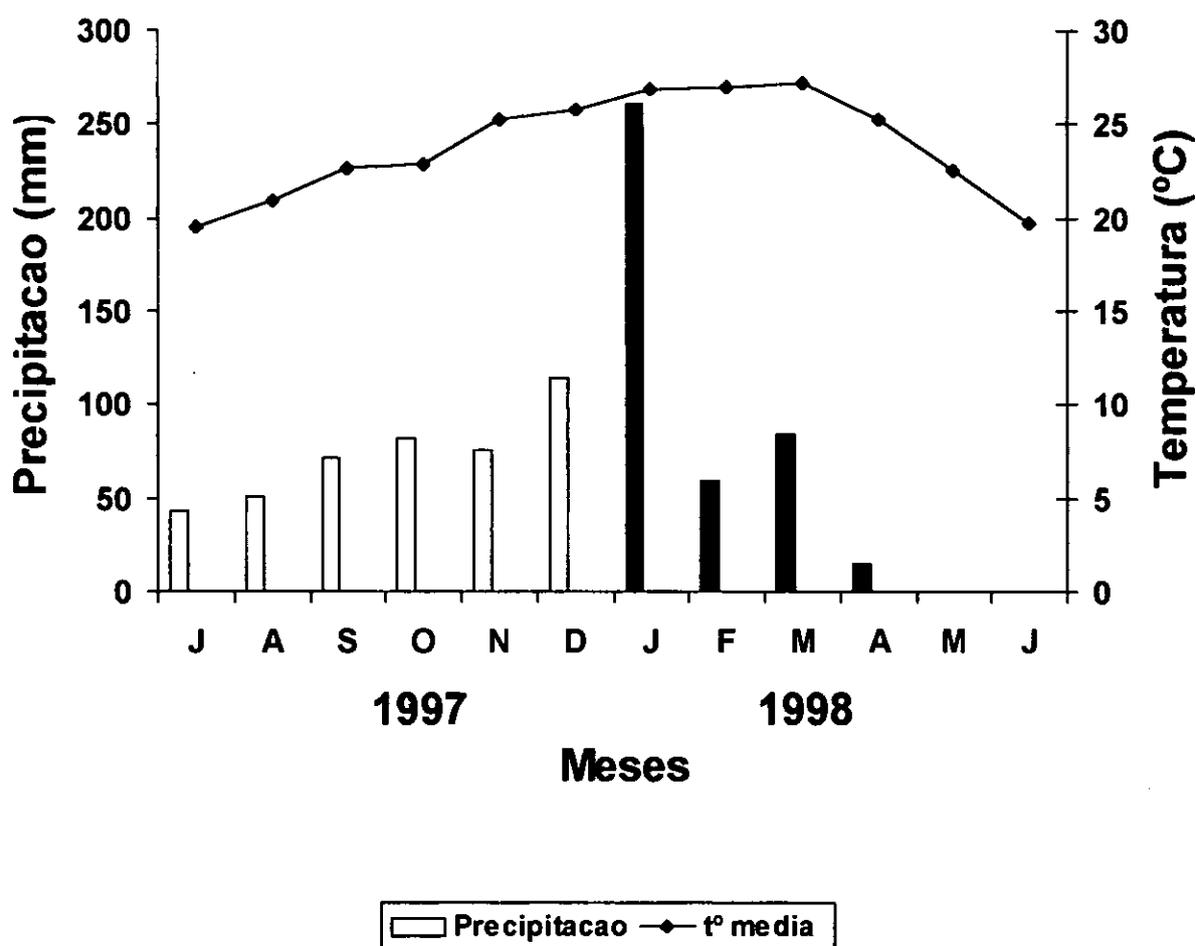


Figura 1: Evolução mensal da precipitação e temperatura média em Boane durante os 6 meses antes do estudo e durante a realização do estudo (em negrito) (Dados cedidos pelo Instituto agrário de Boane).

Um total de 311 membros do complexo *An. gambiae* foram identificados no distrito de Boane dos quais 72 foram capturados em repouso no interior das habitações com o uso do método de captura manual e 239 através da isca humana dentro e fora das habitações. O comportamento da precipitação durante os 6 meses antes e durante o estudo é mostrada na figura 1.

No distrito de Chókwe foram capturados 131 membros do complexo *An. gambiae* em repouso no interior das habitações destes apenas 109 foram amplificados e eram todos *An. arabiensis*.

No distrito de Matutuine foram capturados no interior das habitações, em repouso, 69 mosquitos membros do complexo *An. gambiae*. Desta amostra foi possível identificar 60 espécimes de *A. arabiensis* (tabela 2).

Tabela 2: Números totais de mosquitos do complexo *An. gambiae* identificados nas três regiões estudadas.

Locais de colheita	<i>An. merus</i>			<i>An. arabiensis</i>		
	C.E	C.A	H.R	C.E	C.A	H.R
Boane	285	232	53	26	7	19
Chókwe	-	-	-	109	-	109
Matutuine	-	-	-	60	-	60
Total	285	232	53	195	7	188

C.E- Composição Específica; C.A- Comportamento Alimentar; H.R- Hábitos de Repouso

5.1- OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PCR

Primeira otimização

Durante a primeira otimização, constatou-se que a concentração de 0.875 U de Taq era a concentração mínima de enzima que ainda amplificava consistentemente os fragmentos de DNA de todas as espécies testadas. Enquanto que quantidades elevadas não melhoravam os resultados.

Em relação ao Cloreto de Magnésio os melhores resultados foram obtidos quando fosse adicionado à mistura de reacção uma quantidade correspondente a concentração de 0.25mM num volume total de reacção. Concentrações superiores a 0.25mM não melhoram os resultados, pelo contrário forneciam bandas indesejáveis.

A quantidade de DNA do mosquito correspondente a 1/400X do total de DNA extraído de cada espécime fornecia melhores resultados enquanto que quantidades de 1/200X do volume total do mosquito extraído alguns espécimes não apresentavam bandas de DNA.

Ao contrário do esperado durante esta otimização apareciam em muitos espécimes bandas correspondentes a *An. quadriannulatus*. Reamplificações feitas com o objectivo de controle de qualidade em Liverpool School of Tropical Medicine na Inglaterra mostraram que o DNA desses espécimes correspondiam ao *An. merus*.

Segunda otimização

Na segunda otimização com reagentes de uma outra fonte constatou-se que a concentração mínima do Taq DNA polimerase que permitia a amplificação consistente dos fragmentos do DNA era de 3U. Enquanto que acima desta concentração a enzima amplificava bandas não específicas. O fabricante recomendava quantidades que variassem entre 1 a 5 unidades.

O Tampão do PCR desta segunda optimização continha Cloreto de Magnésio, mas por si só as bandas não eram observáveis. Assim, foi necessário adicionar mais para fazer uma concentração final na reacção equivalente a de 2mM. Concentrações acima de 3mM resultaram no aparecimento de bandas inespecíficas.

Como no caso anterior a quantidade de 1/400X do total do DNA extraído de cada espécime forneceu bons resultados.

Em ambas optimizações não houve diferenças na amplificação segundo o tipo de preservação; espécimes secos e preservados em sílica gel, espécimes conservados em álcool ou mortos por congelamento e o DNA imediatamente extraído mesmo em amostras previamente mortas e deixadas ao relento. O PCR não forneceu sempre bons resultados ao introduzir directamente fragmentos de patas. Isto porque em muitos casos os fragmentos flutuavam acima da mistura de reacção de PCR.

Os métodos de captura não influenciaram os resultados, mesmo aquele que é baseado na pulverização pelo emprego de insecticidas comerciais, o DNA dos mosquitos foi sempre amplificado.

A quantidade de "primers" usado foi a recomendada pelo autor, com a excepção do primer específico ao *Anopheles gambiae* em que se usou uma quantidade maior do que a recomendada. A tabela 3 apresenta a comparação das quantidade de reagentes usados na optimização do PCR do presente estudo com os do PCR standard.

Tabela 3: Comparação de quantidades de reagentes usados entre o PCR standard e o PCR otimizado no presente estudo.

PCR Standard(Scott <i>et al</i> ,1993)		PCR modificado
DNA(total extraído)	1/500	1/400
Taq polimerase	0.625U	3U
MgCl ₂	1mM	2mM
Tampão	1X	1X
Gelatina	-	0.02%
Primer		
UN+ME	12.5ng/ul	12.5ng/ul
GA	6.25ng/ul	22ng/ul
AR	18.75ng/ul	18.75ng
QD	25ng/ul	25ng/ul
Óleo mineral	50ul	50ul
dNTP	10mM	10mM

5.2- EXTRAÇÃO DO DNA

Para a extração do DNA o tampão de lise tinha as seguintes concentrações:

Stock: 100 ml

Tris- HCl	100mM (pH 8.6)	7.88g
EDTA	60mM (pH 8.0)	18.61g

NaCl	80mM	2.92g
SDS	0.5% w/v	0.5g
Sacarose	160 mM	17.11g

Tampão de enzima, pH 8.0 (TE)

Tris- HCl 10mM

EDTA 1mM

EDTA é um catião divalente quelator, é usado em tampões de electroforese de DNA para inativar metais que requerem nucleases.

5.3-REAGENTES E SOLUÇÕES PARA O GEL E TAMPÃO DE ELECTROFORESE

Agarose 1.2%

Agarose é recomendado o de agarose com baixa electroendosmose para muitas aplicações de DNA/RNA.

brometo de Etídio- Intercala com oDNA e RNA para formar complexos de UV-fluorescente.

Tampão TBE 5x (concentração)

Tris base 54g

Ácido bórico 27.5

Ácido bórico-serve para a preparação do tampão TBE, é o tampão mais frequentemente usado para a electroforese de DNA/RNA.

EDTA 2.9g

Água destilada 1 litro

a solução de trabalho de tampão TBE é de 0.5X concentrada. E para cada 500 ml do tampão adiciona-se 10µl da solução de brometo de etídio 10mg/ml.

Amostras do "loading buffer"

"loading buffer" foi preparado por dissolução de 4g de ficoll em 20ml de 25mM de EDTA, a pH 8. Esta solução deve ser ligeiramente aquecida para dissolver os grãos do corante de Orange G adicionados.

Peso molecular do marcador 2176-154 pb

Tabela 4. Quantidades de reagentes necessários para o gel de 1.2% de concentração.

	Agarose (g)	Tampão TBE (ml)	Volume do gel (ml)	Volume do tanque (ml)	Brometo de etídio(µl)	Volume da amostra (µl)
Gel	0.96	0	84	800	20	25
Mini gel	0.6	50	40.4	400	10	15

Filme

Foi usado um filme polaroide preto e branco do tipo 55.

As imagens resultantes da otimização são apresentadas nas figuras que incluem as bandas específicas e o marcador de DNA. (*Figura 2 e 3*).

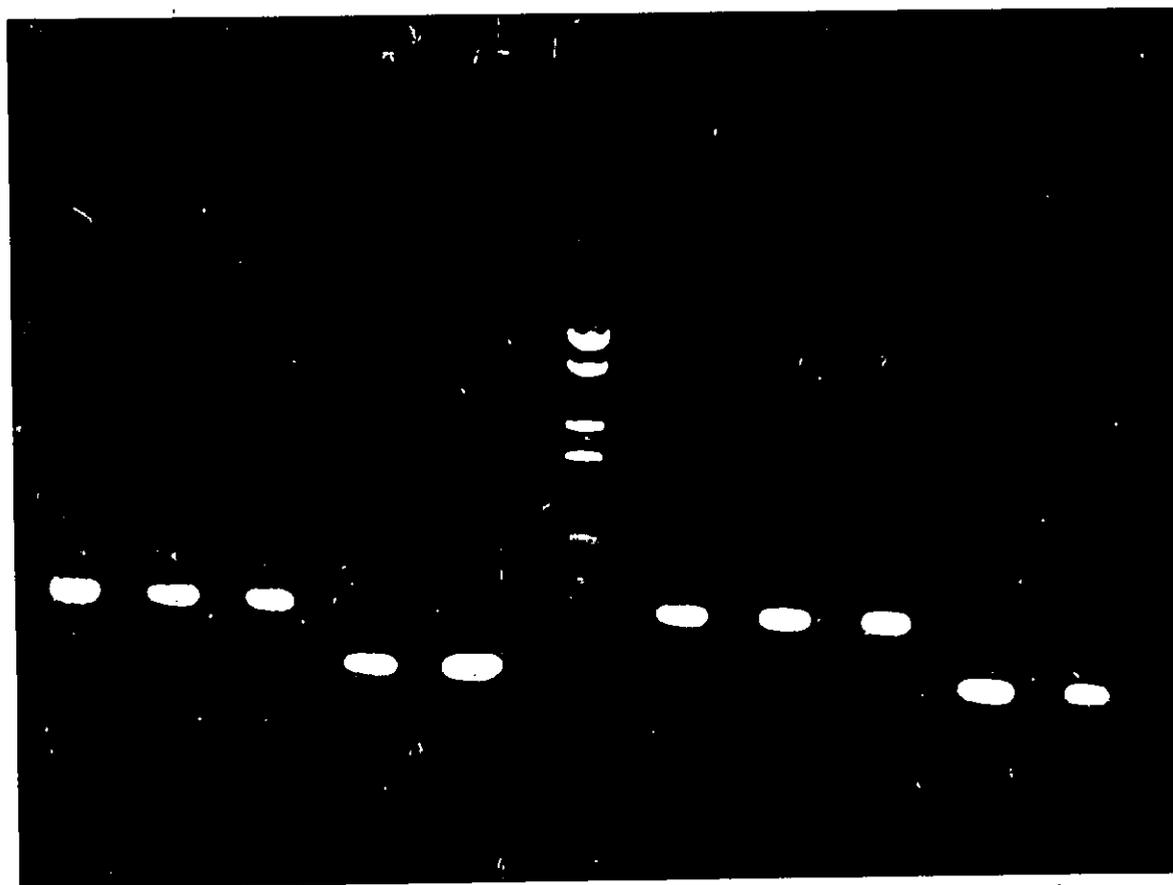


Figura 2: Bandas de DNA produzidas pela amplificação de rDNA-PCR do DNA de *An. arabiensis* e *An. merus*.

esquerda para a direita

Da esquerda para a direita

1-3 *An. merus*

4-5 *An. arabiensis*

6 marcador de peso molecular VI (do topo para a base, com os seguintes pesos: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 220, 154)

7-9 *An. merus*

10-11 *An. arabiensis*

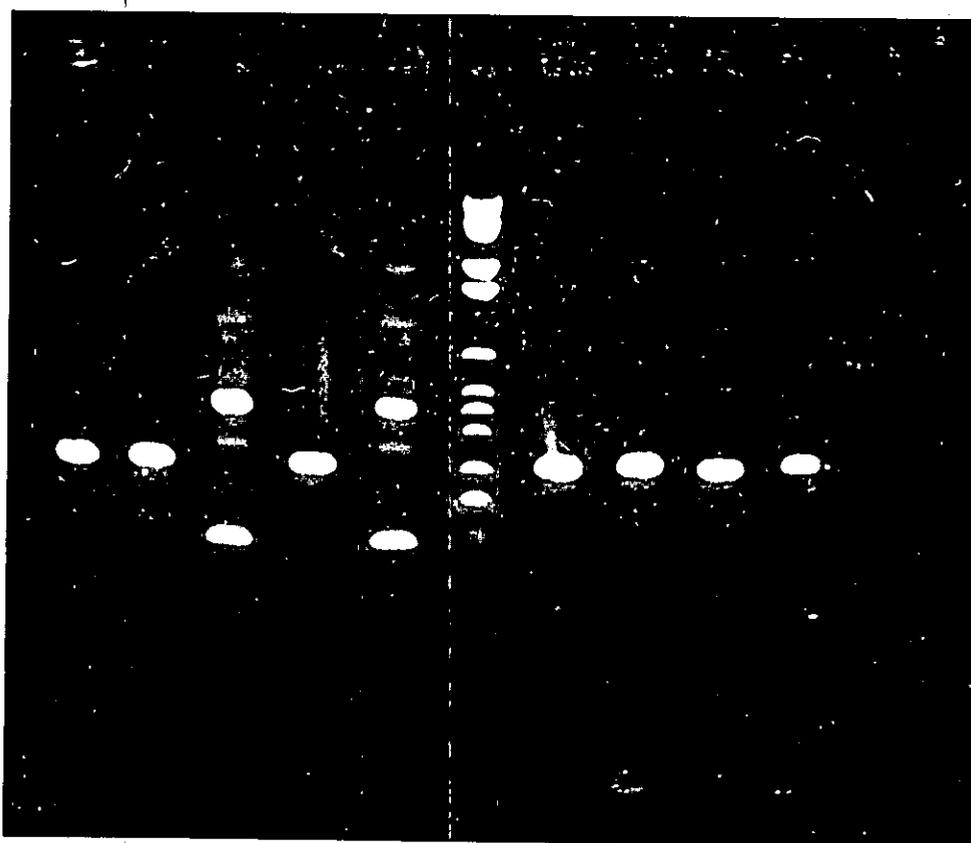


Figura 3: Bandas de DNA produzidas por amplificação de rDNA-PCR do DNA de *An. arabiensis* e *An. merus* (Observa-se duas na coluna 3-5 a banda intensa de baixo peso molecular ao nível de 154pb corresponde a *An. quadriannulatus*).

Da esquerda para a direita.

- | | |
|-------|---|
| 1-2,4 | <i>An. arabiensis</i> |
| 3-5 | <i>An. merus</i> (exibindo uma banda intensa de <i>An. quadriannulatus</i>). |
| 6 | Marcador de peso molecular VI (do topo para a base, são como se segue: 2176,1766, 1230,1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234,220,154) |
| 7-10 | <i>An. arabiensis</i> |
| 11 | controle negativo |

5.4- Composição específica

A tabela 5 mostra a composição específica do complexo *An. gambiae* nas três regiões estudadas. Um total de 311 membros do complexo *An. gambiae* foram identificados no distrito de Boane. Destes 239 foram capturados usando o método de isca humana e 72 foram capturados em repouso através do método manual no interior das habitações. Foram encontradas *An. merus* e *An. arabiensis* simpátricas no distrito de Boane. A primeira espécie foi a mais abundante (81.4%). Nos distritos de Matuine e Chókwe registou-se 100% de *An. arabiensis* num tamanho de amostra de 60 e 109 espécimes respectivamente.

Tabela 5. Composição específica do complexo *An. gambiae* em três regiões do sul de Moçambique durante o período de estudo.

Local	Referência no mapa	Data	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. merus</i>	
Boane	25°2'39"19	15/1	6IH 1Asp	107IH 6Asp	
		16/1	1IH	45IH	
		9/2	8Asp	4Asp	
		12/2	4Asp	9Asp	
		13/2	-	4Asp	
		20/2	1Asp	10Asp	
		23/2	5Asp	20Asp	
		31/3	-	31IH	
		14/4	4IH	-	
		15/4	-	12	
		11/5		29IH	
		19/5		3IH	
		16/6		19larvas	5IH 214larvas
		Chókwe	24°N 26S	5/3	26Asp 26 larvas
32° O 34E	6/3		37Asp 55 larvas		
	7/3		72 Asp		
	11/3		1 larva		
Matutuine	26° 6'S	6/2	44Asp		
	32° 29'E	16/3	16Asp		
		24/4	62 larvas		

IH - Isca humana Asp - Aspiração

5.5-Actividade e comportamento alimentar

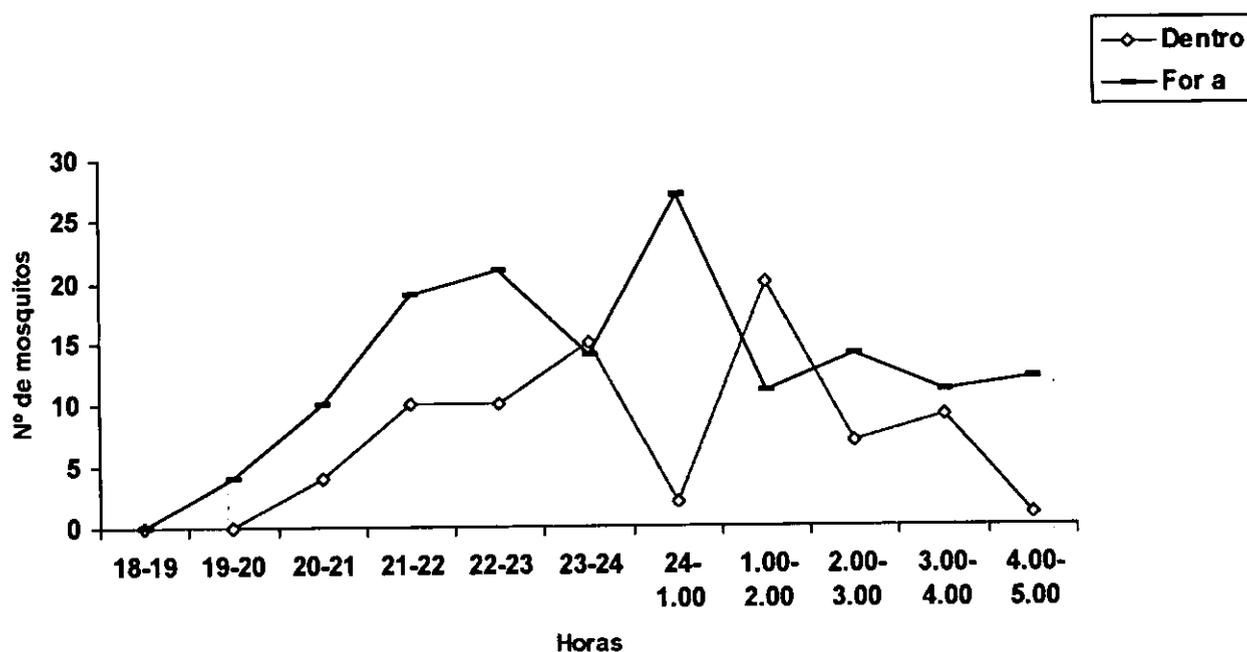


Figura 4: Actividade alimentar de *An. merus* dentro e fora das habitações no bairro 5 do distrito de Boane

Os resultados da actividade alimentar dentro e fora das habitações são apresentados na figura 4.

Um total de 239 membros do complexo *An. gambiae* foram capturados usando o método da isca humana dentro e fora das habitações. Destes 232 (97.1%) eram *An. merus* e 7 (2.9%) eram *An. arabiensis*. A actividade alimentar de *An. merus* é significativamente maior do que for a das habitações ($U=21$ e $P<0.05$)

O *An. merus* apresenta uma actividade baixa ao escurecer com um pequeno crescimento nas primeiras duas horas da noite. Dentro das habitações foram observados dois picos de actividade alimentar o primeiro e maior foi observado entre 23.00-24.00 h e o segundo entre 1.00-2.00 h. Fora das habitações foram também observados dois picos o maior foi observado

entre 24.00-1.00 h é o segundo menor entre 22.00-23.00 h mas a actividade alimentar fora das mesmas continua considerável até ao amanhecer; enquanto que no interior a actividade declina nas primeiras horas da manhã.

Quanto ao *An. arabiensis* foram encontrados apenas 7 espécimes.

Os dados de *An. arabiensis* não são suficientes para as análises estatísticas; pois foram encontrados poucos espécimes (7).

5.6-Habitat das larvas

A colheita de larvas foi feita em dois criadouros nos distritos de Boane. Na Vala que se situa entre 10-15m das habitações com vegetação emergente e relativamente exposta ao sol e a água é limpa e na Ponte que está distante das habitações, exposto ao sol, sem vegetação e com água turva.

No distrito de Boane foram encontradas larvas de *An. merus* e *An. arabiensis* no mesmo criadouro (Vala). A espécie predominante na área de estudo foi *An. merus* (Tabela 6) numa proporção de 65.4% e *An. arabiensis* com 34.6%.

Nos distritos de Matutuine e Chókwe os criadouros se encontravam a uma distancia de 200-300 metros das habitações e são formados pela redução do caudal dos rios. Estão expostos ao sol, sem vegetação e a água é limpa. Nestes criadouros *An. arabiensis* foi a única espécie identificada.

Tabela6: Espécies de larvas colhidas e identificadas nas três regiões de estudo (entre parentises as respectivas percentagens).

Local	Habitat	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. merus</i>
Matutuine	Charco	62 (100%)	-
Boane	Vala	19 (37.3%)	32 (62.7%)
	Ponte	-	182 (100%)
Chókwe	Leito do rio	76 (100%)	-

5.7-Hábitos de repouso

Durante o estudo, no interior das habitações foram registados *An. arabiensis* e *An. merus*.

No distrito de Boane *An. arabiensis* e *An. merus* tiveram frequência de 26.4% com 73.6% respectivamente.

Nos distritos de Chókwe e Matutuine foram registados *An. arabiensis* com frequencias respectivas de 109(100%) e 60 (100%) (Tabela 6).

Tabela 7: Número total de mosquitos e respectivas percentagens de *An. arabiensis*, e *An. merus* colhidos com o uso de diferentes métodos nas três regiões de estudo.

Distrito	Método de colhieta	Total	<i>An. arabiensis</i>		<i>An. merus</i>	
			N	%	N	%
Boane	Isca humana	245	13	5.3%	232	94.7%
	Aspiração	72	19	26.4%	53	73.6%
Chókwe	Aspiração	109	109	100%	-	-
Matutuine	Aspiracao	60	60	100%	-	-

6-DISCUSSÃO

6.1- Optimização

A técnica do rDNA-PCR foi introduzida pela primeira vez e optimizada às condições de Moçambique para a identificação dos espécimes colhidos no campo nos distritos de Boane, Matutuine e Chókwe. Esta técnica mostrou consistência nos resultados observados e Qualquer um dos estágios de desenvolvimento do mosquito foi possível identificar.

Segundo Scott *et al.*, (1993), a sensibilidade da técnica depende do protocolo usado por um determinado laboratório, conservação das amostras (preservadas em álcool, espécimes frescos, em sílica gel ou congeladas), do método de extração e a origem dos reagentes. Consequentemente, cada aplicação nova do PCR requer uma nova optimização.

Estudos feitos no Kenya Medical Research Institute, registaram durante cerca de dois anos uma sensibilidade (proporção de positivos que são correctamente identificados pelo teste) de cerca de 99% nas identificações do *An. gambiae* e *An. arabiensis* em mais de 2000 espécimes do campo dissecados (Beach R, Whittle T, dados não publicados citado por Scott *et al.*, 1993). Todas as evidências sugerem que o método tem 100% de especificidade (proporção de negativos que são correctamente identificados pelo teste) para todos os membros testados do complexo *An. gambiae*. Algumas falhas encontradas são simplesmente o resultado de insuficiência de material a ser amplificado e imediatamente visível no gel agarose.

Para a amplificação do DNA foi usada uma concentração standard de 1/400X do DNA total do mosquito extraído. As amostras foram amplificadas em pequenas quantidades variando de 12 a 24 mosquitos, e o controle negativo sempre foi incluído para permitir a detenção de possível contaminação. O controle positivo consistiu de mosquitos de insectário de identidade conhecida. A amplificação em pequenas quantidades minimiza os gastos de reagentes em caso de ocorrência de erros.

A enzima Taq polimerase constitui o reagente mais caro da reacção. A sua optimização teve dois objectivos: reduzir os custos e encontrar uma concentração ideal, mantendo contudo o nível de sensibilidade considerável.

Ao contrário do esperado, sempre que o DNA de *An. merus* foi amplificado, uma banda muito fraca ao nível de *An. quadriannulatus* foi observada. Segundo Scott *et al.*, (1993) não se conhece o motivo do surgimento desta banda secundária, mas pode ser que um pequeno número de sequência rDNA IGS do *An. merus* contém uma sequência competidora de *An. quadriannulatus* na região do diagnóstico do primer. Paskewitz *et al.*, (1993), sugerem que esta segunda banda deve-se á variabilidade genética comum em espécimes da África Austral. Em algumas ocasiões não foi possível observar bandas devido provavelmente ao excesso do detergente SDS usado no tampão da extracção; que consistiu um forte inibidor da enzima Taq polimerase (Paskewitz *et al.*, 1993).

O aparecimento de muitos espécimes com bandas correspondentes a *An. quadriannulatus* na primeira optimização deveu-se a utilização de MgCl₂ e água destilada preparados no laboratório local (Prof. H. Townson com. pessoal para o Dr. Nelson Cuamba). De facto este problema foi ultrapassado com a aquisição de MgCl₂ e água destilada de alta qualidade proveniente de fornecedores especializados. O PCR optimizado e recomendado nas condicoes prevaescentes no laboratorio de entomologia do Instituto Nacional de Saúde é apresentado na tabela 3 As principais modificacoes consistiram nas quantidades de Taq, cloreto de magnésio, o primer específico de *An. gambiae* que foram, no presente estudo, usados em maiores quantidades em relacao ao PCR standard.

6.2- Composição específica

Em Boane foram encontrados duas espécies do complexo *An. gambiae*, o *An. arabiensis* e *An. merus*. O facto de as duas espécies terem sido encontradas de forma simpátrica na área de estudo, já era esperado, como demonstram os trabalhos anteriores por métodos citogenéticos (Cuamba e Hunt, não publicado) e através de PCR (Cuamba, 1996). Contudo, o facto de *An. merus* ter sido encontrado em maiores quantidades do que o *An. arabiensis* em todos os métodos de captura usados para a colheita de amostras já não era esperado. Tendo em conta estes resultados há uma probabilidade que o *An. merus* seja o principal vector de malária na região dentro do complexo. Isto é corroborado pelo trabalho de Temu *et al.*, (1998), em que o em os índices de infecção de *An. merus* se asselhavam aos do *An. gambiae*, conhecido juntamente com *An. arabiensis* como o mais eficiente vector de malárias (Besansky *et al.*, 1994).

O *An. merus* é conhecido como uma espécie das águas salobres e salinas. Boane dista aproximadamente 30 Km da costa do Oceano Índico (medidos através de GPS) e a presença desta espécie em Boane mostra que nesta região durante a altura de colheitas, os criadouros apresentavam água de natureza salina. Segundo a literatura só em duas ocasiões se conseguiu colonizar esta espécie em águas doces, mas em condições laboratoriais (Mosha e Mutero, 1982 e Coetzee e Le Sueur, 1988). Isto é compatível com a afirmação de que os criadouros do presente estudo apresentavam águas salobres. De facto as amostras de larvas foram colhidas no mês de Junho de 1998, quando já não se registava precipitação considerável conforme mostra o figura1. Isto é, também consistente com o trabalho de Mosha e Mutero (1982), onde estes autores observaram que a população de *An. merus* aumentava devido ao aumento de salinidade nos criadouros como resultado da evaporação das águas dos charcos. A presença de *An. merus* em locais relativamente distantes da costa já foi também verificado noutros estudos na zona Oriental e Central de África (Paterson *et al.*, 1964; Davidson e Lane, 1981

Em Chókwe e Matutuine, o *An. arabiensis* é a única espécie do complexo encontrada. Estes resultados são consistentes com os aqueles de Petrarca *et al.*, (1984) em regiões vizinhas de que esta espécie é o principal componente do complexo *An. gambiae*.

6.3-Actividade e comportamento alimentar

Segundo Gilles e De Meillon (1968) a actividade alimentar de membros do complexo *An. gambiae* nas terras interiores de África, começa com um período de pouca actividade até 21.00-22.00 h, seguido de um crescimento e um pico que é atingido no período compreendido entre 24.00-4.00 h, com uma considerável actividade que continua até amanhecer. Os dados obtidos neste estudo são no geral, comparáveis com aqueles obtidos pelos autores antes citados.

No presente estudo o *An. merus* começa alimentar-se fora das habitações ao anoitecer, com o principal pico entre as 24.00-1.00 h e dentro das mesmas o principal pico foi observado entre 1.00-2.00h e picando mais fora do que dentro. Estes resultados são também comparáveis com os de Mutero *et al.*, (1984), que encontrou *An. merus* com o pico da actividade alimentar dentro e fora das habitações entre as 24.00-1.00 h, diferindo contudo em relação ao período de picada dentro das habitções.

A actividade alimentar foi significativamente maior fora que dentro das habitações o que denota uma tendência exofágica

Em relação ao *An.arabiensis*, o número de espécimes encontrados não foi suficiente para considerções estatísticas. Contudo, resultados de outros autores em outras regiões são contrastantes. Por exemplo no nordeste da África do Sul Braack *et al.*,(1994) encontraram *An. arabiensis* a procura do hospedeiro fora das habitações durante a noite com vários picos, às vezes com grande actividade de picada ao amanhecer; Cuamba e Crook (1994) na Matola

mostraram o *An. arabiensis* com um pico de actividade alimentar que se registam entre 23.00-24.00 horas dentro das habitações, enquanto que fora destas foram observados dois picos; o primeiro entre 21.00-22.00 horas e o último entre 24.00-1.00 horas e no Dukeen (1986) no Sudão mostrou que *An. arabiensis* começa a alimentar-se fora das habitações com o pico de actividade alimentar observado entre as 4.00-5.00 h terminando a mesma ao amanhecer.

O facto de *An. merus* ter sido quase que a única espécie na região fortalece ainda mais a ideia proposta anteriormente de que esta espécie pode ser o principal vector de malária dentro do complexo na região. De facto, White (1974) revendo vários trabalhos conclui que a importância médica de *An. merus* pode ser significativa em zonas onde outros vectores são escassos.

6.4-Habitat das larvas

A literatura disponível realça que o *An. merus* é um mosquito especializado em colonizar águas salobres enquanto o *An. arabiensis* procria melhor em reservatórios de água temporária (Gillies e Coetzee, 1987). Mais recentemente em estudos detalhados em laboratório Coetzee e Le Seur (1988), não encontraram evidência directa de colonização de águas doces pelas larvas de *An. merus*.

No presente estudo, no distrito de Boane, não foram encontrados espécimes de *An. arabiensis* no criadouro semi-permanente (ponte), e poucas foram encontrados no criadouro temporário da Vala. Contrariamente, todos os espécimes do criadouro da ponte eram *An. merus*. A explicação para isto deve estar relacionado com a existência de criadouros favoráveis para o *An. merus*. De facto Mosha e Mutero (1982), mostraram que logo depois das chuvas as populações de larvas e adultos de *An. merus* permaneciam baixas enquanto os charcos estivessem cheios e a salinidade baixa e altas quando a salinidade aumentasse tempo depois das chuvas. No distrito de Boane, a simpatria relativa encontrada nos lugares de reprodução explica a coexistência dos adultos de *An. merus* e *An. arabiensis* nas habitações.

Os criadouros dos distritos de Matutuine e Chókwe são temporários porque são resultado da redução do caudal do rio o que é consistente com a literatura disponível. Esta constatação concorda com os resultados encontrados por Gillies e Coetzee (1987) em que *An. arabiensis* tende a ocorrer em charcos temporários e expostos ao sol.

6.5-Hábitos de repouso

Durante as colheitas foram capturados anofelinos adultos em repouso só no interior das habitações. De referir que esforços foram feitos no sentido de capturar os mosquitos fora de casa, nomeadamente nas bananeiras, tocas de árvores, abrigo de animais, na vegetação e debaixo das Pontes sem resultados isto deve-se provavelmente às condições inóspitas de repouso fora das habitações. Isto é corroborado pelo facto de que na região de Boane estão a ser capturados mosquitos adultos em abrigos artificiais que possuem bolsas que mantêm uma certa humidade e escuridão (Cuamba com. pessoal).

Nos distrito de Matutuine e Chókwe apenas uma espécie foi encontrada *An. arabiensis* em repouso no interior das habitações.

Neste estudo *An. merus* foi capturado em grande quantidade do que *An. arabiensis* o que sugere sua abundância em Boane. Embora seja considerada espécie costeira que se reproduz em águas salobres, Mosha e Subra (1982) citado por Gillies e Coetzee, 1987, Mnzava e Kilama (1986), e Cuamba *et al.*, (1996) registaram *An. merus* a uma distância considerável da costa.

7-Conclusões , recomendações e Limitações do trabalho

- Através deste estudo foi possível o estabelecimento da técnica de rDNA-PCR para a identificação específica de membros do complexo *An. gambiae*.

- O *An. merus* foi a espécie mais abundante em Boane e mostrou ser exofágica. Nas duas outras regiões estudadas o *An. arabiensis* é exclusivamente o único membro do complexo

- O facto de *An. merus* ter sido encontrado apenas larvas de *An. merus* sugere que haja diferenças por espécies na escolha de criadouros.

Estudos longitudinais para confirmar se o *An. merus* é ou não a espécie mais abundante em Boane.

Estudos sobre a efectividade de *An. merus* em Boane para determinar o seu papel na transmissão de malária.

Próximos estudos sobre a composição específica deverão incluir colheitas em várias estações do ano.

Para se validar um trabalho é indispensável que estatisticamente se defina à priori uma amostra mínima. A densidade da população de mosquitos principalmente do complexo *An. gambiae* em zonas tropicais está estritamente dependente primeiro da precipitação, vento, e outros factores. Nenhum método entomológico de captura de mosquitos consegue capturar 100% de mosquitos numa determinada casa ou abrigo natural (Service, 1976). Assim, não foi possível determinar a amostra de mosquitos a serem capturados e processados. Estimou-se trabalhar com uma amostra de 250-300 mosquitos no total; número este que foi contudo ultrapassado no presente trabalho.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Besansky, N.J. Powell, J.R., Caccone, A. Hamm, A. M. Scott, J.A. & Collins F.H. (1994). Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 6885-6888.

Braack, L.E.O., M. Coetzee, R. H. Hunt, H. Biggs, A. Cornel, e A. Gericke (1994). Biting pattern and Host-Seeking Behavior of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Northeastern South Africa. Journal of Medical Entomology, 31(3): 333-339

Bryan, Joan.H.(1979). Observations on the member species of the *Anopheles gambiae* complex in the Gambia, West Africa. Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene, 4 : 463 - 465.

Coetzee, M. e Le Sueur, D. (1988). Effects of salinity on the larve of some Afrotropical anopheline mosquitoes. Medical and Veterinary Entomology, 2:385-390.

Collins, F.H., Mendes, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besanky, N.J. e Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 37:37-41.

Colluzi, M. e Sabatini, A. (1967). Cytological Observations on Species A and B of the *Anopheles gambiae* Complex. Parassitologia, 9: 73-88.

Colluzi, M. e Sabatini, A. (1968). Cytological Observations on species C of the *Anopheles gambiae* complex. Parassitologia, 10:155-165.

Colluzi, M. e Sabatini, A. (1969). Cytological Observations on the Saltwater Species *Anopheles merus* and *Anopheles mOelas* of the gambiae complex. Parassitologia, 11: 177-187.

Colluzi, M., Sabatini, A. Petrarca, V.e Di Deco, M.A. (1979). Cromossomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.73,483-497.

Coluzzi, M. (1992). Malaria vector analysis and control. Parasitology Today, 8:113-118.

Comissao Nacional do Plano,(1993). Dados não publicados.

Cristina, Matusse (1996) Mulheres chefes de famílias. Um estudo das actividades produtivas, reprodutivas e comunitárias das mulheres chefes de famílias em Punguine istrito de Chókwe. Tese de licenciatura. 36 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

Cuamba,N., (1992). Composição etária e comportamento alimentar de *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* Gilies em dois ecotipos da província de Maputo. VIII Jornadas de Saúde, Maputo, Moçambique.

Cuamba, N., Theron, D., Crook, S., Dgedge, M. (1996). Contribuição ao conhecimento do Complexo *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) em Moçambique a sul da latitude 19°. Revista Médica de Moçambique,7(1-2): 17-19.

Cuamba, Nelson. J. Crook, Sally. (1994). Sazonalidade e comportamento alimentar de *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) numa região periurbana de Maputo. Revista Médica de Moçambique, 5(4): 24-27.

Cuamba, N.J.B. (1996). Application of DNA-based techniques to the study of species composition and genetical variation in the *Anopheles gambiae* complex in Southern Mozambique. MSc Thesis Degree. 59 pp. Liverpool, UK. Liverpool School of Tropical Medicine.

De Meillon, B. (1941b). Guia para a identificação dos anofelinos da colónia de Moçambique, Separata de trabalho de estudos entomológicos da colónia de Moçambique. Edição da estação antimalárica, 77pp Lourenço Marques,.

Donnelly, M.J., N. Cuamba, J.D. Charlwood, F.H. Collin e H. Townson (1999). Population structure in the malaria vector, *An. arabiensis* Patton in East Africa. Heredity. (In press).

Dukeen M.Y.H. (1986): Ecology of the malaria vector *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera Culicidae) by the Nile in Northern Sudan. Bulletin of Entomological Research, 76: 451-467.

Fowler, J., L. Cohen e P. Jarvis (1998). Practical Statistics for Field Biology, 2ª edition, 257pp. England, John Wiley & Sons

Gillies, M.T. e Coetzee, M. A Supplement to the Anopheline of Africa south of the Sahara, (1987). Johannesburg. The publication of the south African Institute for Medical research. 55, 143pp.

Gillies, M.T. e De Meillon, B. The Anopheline of Africa South of Sahara (Ethiopian Zoogeographical region), (1968). Johannesburg. The publication of the South African Institute for Medical Research. 54, 341pp.

Gelfand, D.H. e T.H. White, (1990). Thermostable DNA Polymerases. In: Innis, Michael. A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky e Thomas J. White (editores). PCR Protocols; A Guide to Methods and Applications. pp 129-141. Academic Press, INC. United States of America.

Hunt, R.H., Coetzee, M. e Fettene, M. (1998). The *Anopheles gambiae* complex: A new species from Etiopia. Transactions of the Royal Society Medicine and Hygiene, 92: 231-235.

Instituto Nacional de Estatística. II Recenseamento Geral da População e Habitação (1997). Resultados definitivos. Província de Maputo. 9 pp.

Lehane, M. J. (1991). The Biology of Bloodsucking insects. London. 25-49 pp.

Mahon, R.J., Green, C.A. e Hunt, R.H. (1976). Diagnostic allozymes for the routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: *Culicidae*). Bulletin of Entomological Research, 66: 25-31.

Miles, J.S. (1978). Enzyme Variation in the *Anopheles gambiae* Giles Group of Species (Diptera : *Culicidae*). Bulletin of Entomological Research, 68: 85-96.

Miles, J.S. (1979). A biochemical Key to Adult Members of the *Anopheles gambiae* Group of Species (Diptera: *Culicidae*). Journal of Medical Entomology, 15: 297-299..

Mnzava, A.E.P., Kilama, W.L.(1986). Observations on the distribution of the *Anopheles gambiae* complex in Tanzania. National Institute for Medical Research, Tanzania.43 : 277-282

Mosha, F.W. e C.M. Mutero (1982). The influence of salinity on larval development and population dynamics of *Anopheles merus* Donitz (Diptera: Culicidae). Bulletin of Entomological Research. 72: 119-128.

Mutero, C.M., F.W.Mosha e R.Subra (1984). Biting activity and resting behaviour of *Anopheles merus* Donitz (Diptera: Culicidae) on the Kenya Coast. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 78(1):43-7

Paskewitz, S.M. , Ng. K., M. Coetzee e R.H. Hunt (1993). Evaluation of the Polymerase Chain Reaction method for identifying members of The *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) complex in South Africa. Journal of Medical Entomology, 30: 953-957.

Petrarca, V., G.C. Carrara, M.A. Di Deco e G. Petrangeli (1984). Osservazione citogenetiche e biometriche sui membri del complex *Anopheles gambiae* in Mozambique. Parassitologie, 26: 257-259.

Perfis de Desenvolvimento Distrital. ACNUR e PNUD. Distrito de Matutuine. Provincia de Maputo. 3pp.

Petrarca, V., Carrara, G.C., Di Deco, M.A., Petrangeli, G. (1984). Osservazioni citogenetiche e biometriche sui membri del complexo *Anopheles gambiae* in Mozambico. Parassitologia, 26 e 7-259.

Sambrook, J., E.F. Fritsch e T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratory Press.

Scott, J.A., Brogdon, William.G. e Collins, F.H. (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the Polymerase Chain Reaction. American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 49(4):520-529.

Service, M.W. (1976). Mosquito Ecology. 583 pp. England, A Halsted Press Book

Service, M.W. (1993). The *Anopheles* vector. In: Gilles, D.A. Warrell (editores). Bruce-Chwatt's Essential Malariology, Third edition, pp 96-123. Great Britain, Edward Arnold.

Temu, E.A., J.N. Minjas., M. Coetzee, R. H. Hunt e C.J. Shiff (1998). The role of four anopheline species (Diptera: Culicidae) in malaria transmission in coastal Tanzania. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 92, 152-158

White, G.B. (1974). *Anopheles gambiae* Complex and Disease Transmission in Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 68(4):278-295

ANEXOS

ANEXO1: Mann-Whitney U test

Amostra 1	0	4	10	8	15	2	19	5	9	1
Amostra 2	4	10	19	23	14	26	12	13	9	12

1-Lista de observações em ambas amostras em ordem ascendente, assinalando os seus ranks.

Observações :

0 1 2 4 4 5 8 9 9 10 10 12 12 13 14 15 19 19 23 26

Ranks:

1 2 3 4_{1/2} 4_{1/2} 6 7 8_{1/2} 8_{1/2} 10_{1/2} 10_{1/2} 12_{1/2} 12_{1/2} 14 15 16 17_{1/2} 17_{1/2} 19

2- Soma dos ranks de cada amostra;

$$R_1 = 1+2+3+4_{1/2} +6+7+8_{1/2}+10_{1/2}+16+17_{1/2}=76$$

$$R_2 = 4_{1/2} +8_{1/2}+10_{1/2}+12_{1/2}+12_{1/2}+14+15+17_{1/2}+19+20=134$$

3- Calcular o teste estatístico U_1 e U_2 .

$$U_1 = n_1 n_2 + n_2(n_2+1)/2 - R_2 = 10 \cdot 10 + 10(10+1)/2 - 134 = 21$$

$$U_2 = n_1 n_2 + n_1(n_1+1)/2 - R_1 = 10 \cdot 10 + 10(10+1)/2 - 76 = 79$$

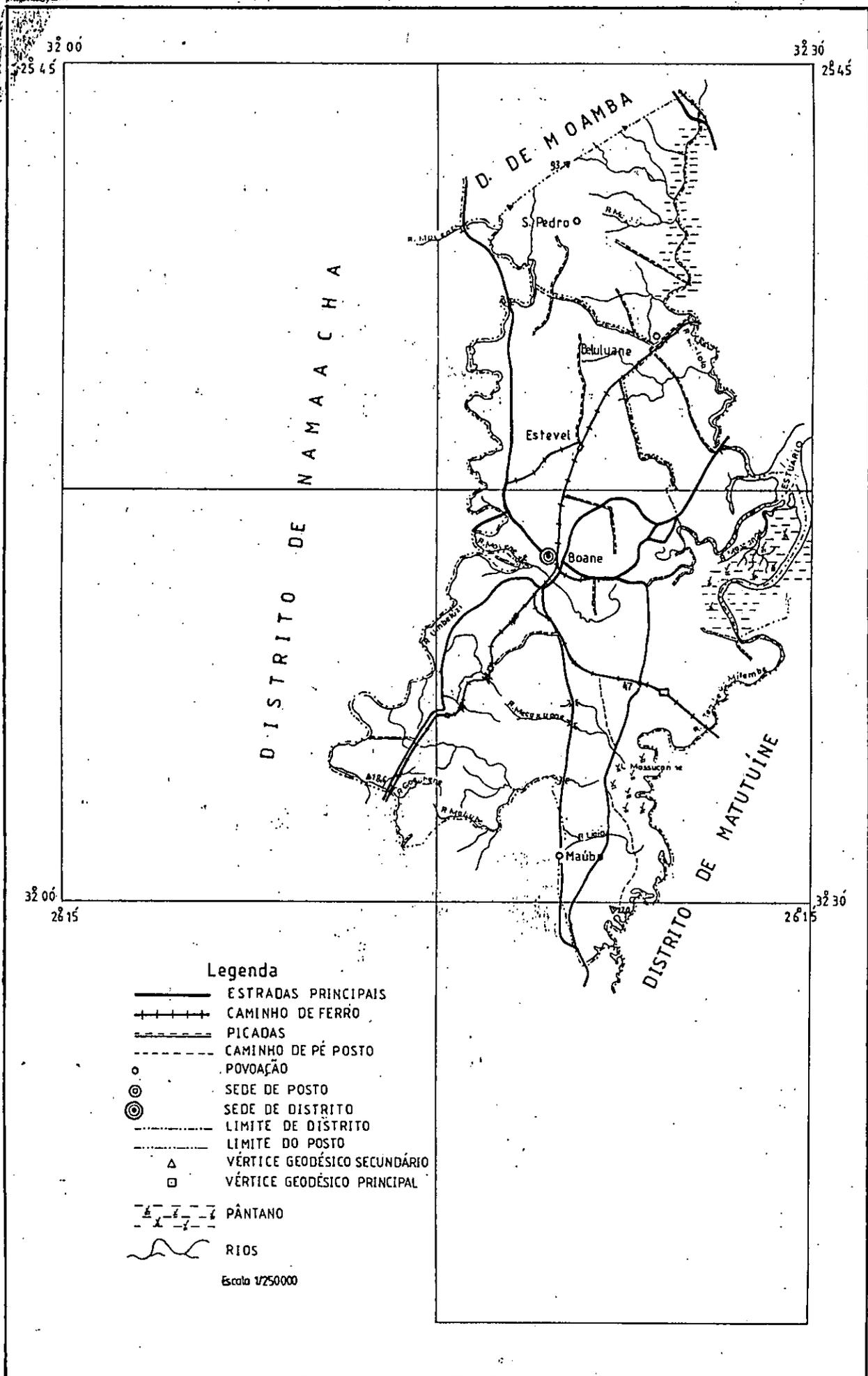
4- Testar neste ponto que:

$$U_1 + U_2 = n_1 n_2 \quad 21 + 79 = 10 \cdot 10$$

$$100 = 100$$

5- Seleccionar o mais pequeno valor dos 2 e comparar em que valor na tabela pelos valores de n_1 e n_2 . ($U=21; P<0.05$)

Anexo2 Mapa do distritito de Boane



DISTRITO DE MATUTUINE

