

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ESTUDO DA FAUNA DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) E DETECÇÃO DE  
ARBOVÍRUS NO PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO ROLA-MOÇA E  
ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE FECHOS – MINAS GERAIS**

por  
Guilherme Garcia Pinheiro

Belo Horizonte  
2019

**DISSERTAÇÃO**

**MCS – IRR**

**G. G. PINHEIRO**

**2019**

**GUILHERME GARCIA PINHEIRO**

**ESTUDO DA FAUNA DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) E DETECÇÃO DE  
ARBOVÍRUS NO PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO ROLA-MOÇA E  
ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE FECHOS – MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de concentração Transmissores de Patógenos.

Orientação: Dr. José Dilermando Andrade Filho

Coorientação: Dr. Luciano Andrade Moreira

Belo Horizonte  
2019

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

P654e Pinheiro, Guilherme Garcia  
2019

Estudo da fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae) e detecção de arbovírus no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos – Minas Gerais / Guilherme Garcia Pinheiro – Belo Horizonte, 2019

XI, 62 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 42-45

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Transmissores de patógenos

1. Arbovírus/isolamento & purificação 2. Febre amarela/etnologia 3. Mosquitos vetores I. Título II. Andrade Filho, José Dilermando (Orientação). III. Moreira, Luciano Andrade (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 595.7

**GUILHERME GARCIA PINHEIRO**

**ESTUDO DA FAUNA DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) E DETECÇÃO DE  
ARBOVÍRUS NO PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO ROLA-MOÇA E  
ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE FECHOS – MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração Transmissores de Patógenos.

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho (IRR) Presidente

Prof. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (IRR) Titular

Prof. Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa (UFMG) Titular

Prof. Dra. Raquel Aparecida Ferreira (IRR) Suplente

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 22/02/2019**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Maria Angélica Oliveira, curadora adjunta da Coleção de Mosquitos Neotropicais, por ter ajudado na concepção do trabalho, ensinado boa parte do que sei hoje sobre mosquitos, e ter me feito admirar esses insetos incríveis. Também agradeço a Dra. Marcele Rocha que me introduziu no mundo da biologia molecular e foi praticamente uma terceira orientadora deste trabalho, foi para o campo, ajudou na bancada e na revisão deste trabalho.

Agradeço a equipe da Coleção de Mosquitos pelo apoio nas coletas, principalmente a Ana Lima, amiga de anos e ex-colega de graduação que tive o prazer de dividir a mesma sala por dois anos. Agradeço também ao grupo de pesquisa Mosquitos Vetores por todo apoio durante os experimentos.

Agradeço imensamente ao Instituto René Rachou pelo apoio logístico ao trabalho principalmente à equipe do Serviço de Infraestrutura e à Secretaria Administrativa. Agradeço também a FAPEMIG pelo suporte financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obviamente gostaria de agradecer meu orientador Dr. José Dilermando e meu coorientador Dr. Luciano Moreira pela paciência e pelo apoio em todas as etapas do trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer minha família pelo apoio incondicional, principalmente minha irmã Daniela por me ajudar com os mapas deste trabalho e do artigo. Finalmente agradeço todos meus amigos, que tiveram muita paciência, já que por dois anos eu só falei sobre este trabalho.

## RESUMO

O Brasil vem sofrendo surtos de diversas arboviroses, dentre as quais destaca-se a febre amarela. O estado de Minas Gerais enfrentou no final de 2016 até meados de 2018, dois surtos de febre amarela silvestre com 1.002 casos confirmados e 340 óbitos. Este trabalho apresenta resultados sobre a detecção do vírus da febre amarela em mosquitos de duas áreas de conservação estadual, Parque Estadual da Serra do Rola Moça e Estação Ecológica de Fechos, ambos na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Além deste ser o primeiro levantamento das espécies de mosquito destas unidades de conservação este trabalho é de grande importância para acompanhar a circulação de vírus no ambiente silvestre próximo a grandes centros urbanos. Os mosquitos foram amostrados usando métodos de coleta manual e armadilhas automáticas com isca de CO<sub>2</sub>, entre setembro de 2017 e maio de 2018. Foram capturados 867 mosquitos distribuídos em 20 espécies, sendo as mais abundantes *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (von Humboldt, 1819) (31,3%), *Limatus durhamii* Theobald, 1901 (19,1%) e *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921 (18,2%). Extraiu-se o RNA total dos mosquitos e realizada PCR em tempo real para detecção do genoma do vírus da febre amarela, chikungunya, mayaro, Zika e dengue. Foram processados 778 mosquitos e, foi observada uma taxa de infecção pelo vírus da febre amarela de 8,2% para *Hg. janthinomys* (13 mosquitos positivos de 158 coletados), espécie essa apontada como principal vetor do vírus da febre amarela no Brasil.

**Palavras-chave:** Arbovírus, Febre amarela, Mosquitos.

## ABSTRACT

Brazil has experienced several arbovirus outbreaks in recent years, among which yellow fever stands out. The state of Minas Gerais faced outbreaks of sylvatic yellow fever in 2017 and 2018, with 1,002 confirmed cases and 340 deaths. This work presents the results of survey efforts to detect the yellow fever virus in mosquitoes of two conservation areas, Serra do Rola-Moça State Park and Fechos Ecological Station, both in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. In addition to being the first survey of mosquito fauna in these conservation units, this work demonstrates the importance of monitoring the circulation of viruses near large urban centers. A total of 867 mosquitoes of 20 species were collected using manual collection methods and automatic traps with CO<sub>2</sub> lures, between September 2017 and May 2018, the most abundant being *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (von Humboldt, 1819) (31.3%), *Limatus durhamii* Theobald, 1901 (19.1%) and *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921 (18.2%). Total RNA was extracted from the mosquitoes for real-time PCR analysis for yellow fever, chikungunya, mayaro, Zika and dengue viruses. The yellow fever infection rate was 8.2% for *Hg. janthinomys* (13 mosquitoes of 158 collected), which is the main vector of sylvatic yellow fever in Brazil

**Keywords:** Arboviruses, Yellow fever, Mosquitoes.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1 – (a):</b> Quantificação de RNA de YFV por mosquito ( <i>Hg. janthinomys</i> ).	
<b>(b):</b> Quantificação de RNA de YFV por amostra isolada em 7 e 10 dias pós inoculação. ....	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Série histórica do número de casos humanos confirmados para febre amarela e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, 1980 a maio de 2018 .....	16
<b>FIGURA 2</b> – Distribuição dos casos humanos e epizootias confirmadas para febre amarela na região Sudeste, entre julho/17 e junho/18 .....	16
<b>FIGURA 3</b> - Mapa de localização e acessos do Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e da Estação Ecológica de Fechos .....	19
<b>FIGURA 4</b> – Pontos de coleta no Parque estadual da Serra do Rola-Moça e na Estação Ecológica de Fechos .....	23
<b>FIGURA 5</b> – Ponto de coleta na Área de Proteção Especial do Barreiro no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça .....	24
<b>FIGURA 6</b> – Ponto de coleta na Área de Proteção Especial do Mutuca no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça .....	24
<b>FIGURA 7</b> – Ponto de coleta na Área de Proteção Especial Catarina no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça .....	25
<b>FIGURA 8</b> – Ponto de coleta na Área de Proteção Especial de Fechos na Estação Ecológica de Fechos .....	25
<b>FIGURA 9</b> – Métodos de coleta: armadilha automática modelo HP com isca de CO <sub>2</sub> (a). Capturador automático (b) .....	26
<b>FIGURA 10</b> – Principais espécies capturadas: <b>(a)</b> <i>Aedes albopictus</i> . <b>(b)</b> <i>Anopheles eiseni</i> . <b>(c)</b> <i>Haemagogus janthinomys</i> . <b>(d)</b> <i>Haemagogus leucocelaenus</i> <b>(e)</b> <i>Limatus durhamii</i> . <b>(f)</b> <i>Sabethes purpureus</i> .....	33

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Sequência de primers e sondas utilizadas no RT-qPCR .....	28
<b>TABELA 2</b> – Número de mosquitos coletados por método de coleta no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos .....	31
<b>TABELA 3</b> – Quantidade de mosquitos por espécie, coletados em 2017 e 2018 no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos.....	32
<b>TABELA 4</b> –Taxa de infecção por YFV em <i>Haemagogus janthinomys</i> .....	34

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APE – Área de Proteção Especial

COPASA – Companhia de Saneamento de Minas Gerais

CHIKV – *Chikungunya virus*

CMN – Coleção de Mosquitos Neotropicais

DENV – *Dengue virus*

EEF – Estação Ecológica de Fechos

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

IEF – Instituto Estadual de Florestas

IRR – Instituto René Rachou (FIOCRUZ Minas)

MAYV – *Mayaro virus*

MIR – *minimum infection rate*

PESRM – Parque Estadual da Serra do Rola-Moça

RT-qPCR – Transcrição reversa seguida de reação da cadeia da polimerase quantitativa

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

YFV – *Yellow fever virus*

ZIKV – *Zika virus*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Mosquitos .....	12
1.2. Arbovírus e arboviroses .....	14
1.2.1. Febre amarela .....	14
1.2.2. Outras arboviroses .....	17
1.3. Áreas de estudo .....	18
1.4. Justificativa .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1. Objetivo geral .....	22
2.2. Objetivos específicos .....	22
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	23
3.1. Pontos de coleta .....	23
3.2. Coletas e identificação dos mosquitos .....	26
3.3. Detecção de vírus .....	27
3.4. Multiplicação viral em cultura de células .....	29
3.5. Análise dos dados .....	30
3.6. Licenças .....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	41
REFERÊNCIAS .....	42
ANEXOS .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Mosquitos

Mosquitos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Culicidae, classificados em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae. Os Culicídeos (com exceção das espécies do gênero *Toxorhynchites*) possuem hábito alimentar hematofágico, sendo vetores de microfilárias, protozoários e inúmeras arboviroses de importância para a saúde pública (FORATTINI, 2002).

Os mosquitos são holometábolos, ou seja, apresentam no seu ciclo de vida a fase de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. As fêmeas depositam os ovos próximos ou em corpos d'água, sendo que diferentes espécies ovipõem em criadouros distintos, como poças no solo, recipientes artificiais, cavidades de árvores e lagos (FORATTINI, 2002). Foram descritas até o momento cerca de 3.600 espécies adaptadas a vários tipos de ambiente, destas 600 já incriminadas como vetor de algum patógeno (FORATTINI, 2002; HARBACH, 2011).

No Brasil, temos como principais vetores silvestres de doenças, os mosquitos dos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes* e *Anopheles*. Do primeiro gênero citado, *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921 é a espécie de maior importância, sendo considerado o principal vetor de febre amarela. Esta espécie destaca-se pela ampla distribuição sendo encontrado de Santa Catarina até o norte da América do Sul (FORATTINI, 2002). Essa espécie, como a maioria em seu gênero, é primatófila, ou seja, se alimenta preferencialmente em primatas e também é acrodendrúfila, habitam as copas das árvores, onde os primatas também habitam. Em geral, como outros mosquitos do gênero, a espécie deposita seus ovos em buracos de árvore úmidos (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994).

Outras espécies deste gênero com grande importância são: *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924), principal vetor da febre amarela no Rio Grande do Sul e *Haemagogus (Haemagogus) equinus* Theobald, 1903, principal vetor na porção norte da América do Sul até metade da América Central (FORATTINI, 2002; MARCONDES & ALENCAR, 2010).

Do gênero *Sabethes*, temos como mosquitos mais abundantes no país as espécies: *Sabethes (Sabethoides) chloropterus* (von Humboldt, 1819), *Sabethes (Sabethoides) glaucodaemon* (Dyar & Shannon, 1925) e *Sabethes (Sabethes) cyaneus* (Fabricius, 1805) (FORATTINI, 2002).

Os mosquitos do gênero *Sabethes*, assim como em *Haemagogus* spp., também tem preferência por se alimentar em primatas não humanos, porém tem uma menor exigência quanto ao habitat, ocupando tanto a copa das árvores quanto o nível do solo. Esses mosquitos geralmente depositam seus ovos em água acumulada na vegetação, como buracos de árvore e bromélias. Eles têm um comportamento mais “tímido” ao se aproximar do homem, diferente dos *Haemagogus* spp. que são mais vorazes (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994).

Dentre os anofelinos podemos destacar o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926, principal transmissor de malária humana no Brasil. É considerado um mosquito antropofílico e bem adaptado a ambientes modificados pelo homem (FORATTINI, 2002). No Brasil, está distribuído do norte do país ao estado do Paraná, com exceção de áreas mais secas e com elevadas altitudes (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994).

No meio urbano e peri-urbano pode-se destacar três espécies principais, nenhuma delas nativa do Brasil: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) e *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823. O *Ae. aegypti* é originário da África, está bem adaptado ao ambiente urbano e é extremamente antropofílico, e endófilo (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). É o principal vetor no Brasil do vírus da dengue (DENV), Zika vírus (ZIKV) e vírus causador da chikungunya (CHIKV) e está bem distribuído em áreas urbanas de todos os estados do país (FORATTINI, 2002; PADILHA *et al.*, 2018).

O *Ae. albopictus* é um mosquito originário do sudeste asiático, mas que hoje já pode ser encontrado na África, Europa e Américas. É um mosquito que se alimenta em animais, bem como no homem, e habita bordas de matas em áreas periurbanas e matas dentro de cidades, como áreas verdes de médio porte e parques (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). É o principal vetor de DENV na Ásia, mas sua importância epidemiológica no Brasil ainda é pouco estudada apesar de já ter sido encontrado infectado naturalmente com o vírus no Brasil (MEDEIROS *et al.*, 2018). Em laboratório já foi infectado com 22 arbovírus diferentes incluindo vírus da febre amarela (YFV) (PESSOA *et al.*, 2013).

Por último o *Cx. quinquefasciatus* foi descrito originalmente em Nova Orleans nos EUA, porém apresenta distribuição em vários continentes, principalmente, na zona tropical (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). É uma espécie extremamente antropofílica, endofílica e de hábito alimentar noturno. Eles são

considerados mosquitos urbanos, e estão presentes em praticamente todas as cidades do país (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). No Brasil ele é o principal vetor da filariose bancroftiana, hoje com transmissão quase nula no país (AGUIAR-SANTOS *et al.*, 2013).

## 1.2 Arbovírus e arboviroses

Arbovírus (*Arthropod-borne virus*) são vírus transmitidos por artrópodes com parte de seu ciclo replicativo dentro dos insetos. Eles são transmitidos para o hospedeiro vertebrado pela picada de artrópodes hematófagos infectados, podendo ser também transmitidos por via transovariana entre os insetos com taxas muito baixas, mas que são importantes para a manutenção do arbovírus na natureza (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). Já foram identificadas aproximadamente 150 espécies de arbovírus relacionadas a doenças em humanos e outros vertebrados. O ciclo de transmissão é mantido pelos vetores (artrópodes) e reservatórios/ hospedeiros vertebrados (primatas, pequenos mamíferos e aves) (HUANG *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2014;).

### 1.2.1 Febre amarela

A febre amarela é uma doença aguda grave, com alta letalidade, causada pelo *Yellow fever virus* (YFV), um arbovírus da família Flaviviridae. O vírus é transmitido a seus hospedeiros através da picada de fêmeas de mosquitos da família Culicidae. A doença apresenta dois ciclos distintos, o silvestre e o urbano. Estes dois ciclos apesar de terem semelhanças quanto a sua etiologia e evolução da doença, apresentam vetores e hospedeiros distintos (MONATH & VASCONCELOS, 2014; GOLDANI, 2017).

Nas Américas o ciclo silvestre tem como principal vetor o *Hg. janthinomys*. Os principais hospedeiros são primatas não humanos, como os bugios (*Alouatta* sp.) e os micos (*Callithrix* sp.), sendo que o homem é infectado acidentalmente. O ciclo urbano tem como principal vetor o *Ae. aegypti*, entretanto, não há relatos de febre amarela urbana no Brasil desde 1942 (FRANCO, 1969; CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). Contudo, no continente Africano o ciclo urbano é o responsável pelo maior número de casos humanos registrados anualmente (MONATH & VASCONCELOS, 2014).

O YFV depois de ser transmitido ao homem, passa por um período de incubação de 3 a 6 dias, sendo que, na maioria das pessoas infectadas, não causa

sintomas. Quando apresentam sintomatologia, são sintomas comuns de outras arboviroses como: febre, calafrios, dores no corpo, fadiga e náuseas, que tendem a sumir em 3 a 4 dias (WHO, 2018).

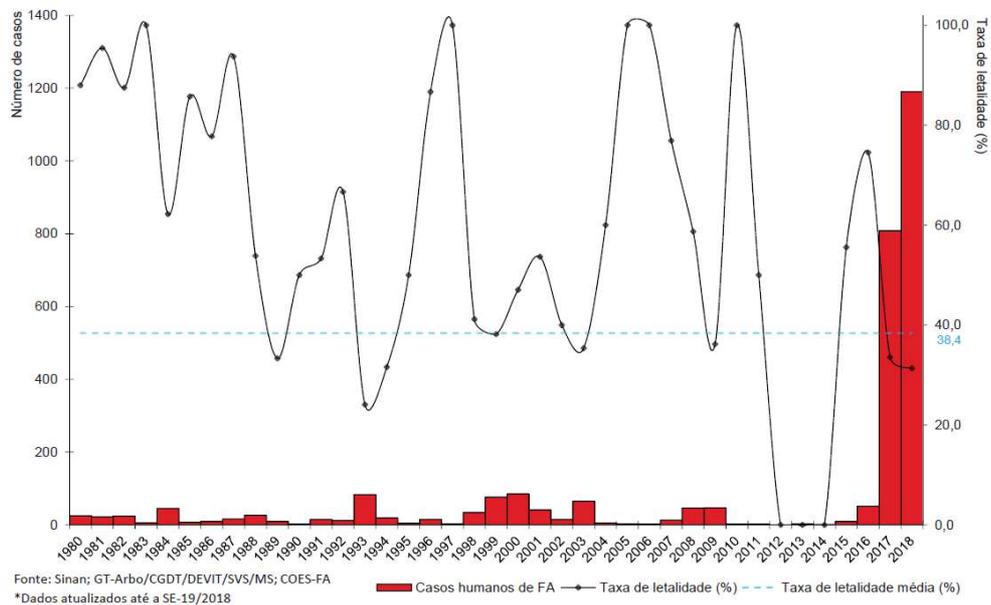
Aproximadamente, 15% dos pacientes apresentam um agravamento da doença de, em média, 24 horas após o desaparecimento dos sintomas iniciais. Esses pacientes apresentam febre alta, icterícia, falhas no sistema renal e hepático, além de hemorragias. A icterícia é a condição que dá nome à doença, pois deixa a pele do paciente amarelada devido ao dano hepático. Entre de 7 a 10 dias aproximadamente, metade dos pacientes com essa condição vem a óbito (WHO, 2018).

O diagnóstico da febre amarela na fase inicial é muito difícil devido ao curto período de viremia e por apresentar sintomas comuns a outras arboviroses (dengue, Zika e chikungunya), e doenças como malária, hepatites virais e leptospirose. Durante a viremia, o vírus pode ser detectado por RT-PCR utilizando-se iniciadores específicos para o YFV. Após a fase aguda a doença só pode ser identificada com testes imunológicos como o ELISA e que detectam anticorpos produzidos em resposta a presença do vírus (WHO, 2018).

Na fase inicial da doença, os cuidados médicos de qualidade, aumentam as chances de sobrevivência (WHO, 2018). Não há antivirais específicos para tratar a febre amarela, mas os sintomas como a desidratação, febre, falhas renais e no fígado e infecções secundárias, podem ser tratados. A letalidade da doença está muito ligada à condição imunológica e saúde geral do hospedeiro (WHO, 2018).

Segundo a WHO (2017), 47 países estão em áreas endêmicas para a febre amarela, destes 34 estão na África e 13 na América Latina, sendo que 90% dos casos reportados estão concentrados no continente africano. Entre o final de 2016 e meados de 2018 foram registrados no Brasil, dois dos maiores surtos em termos de número de casos dos últimos 50 anos (Figura 1) (FRANCO, 1969; SVS/MS, 2018).

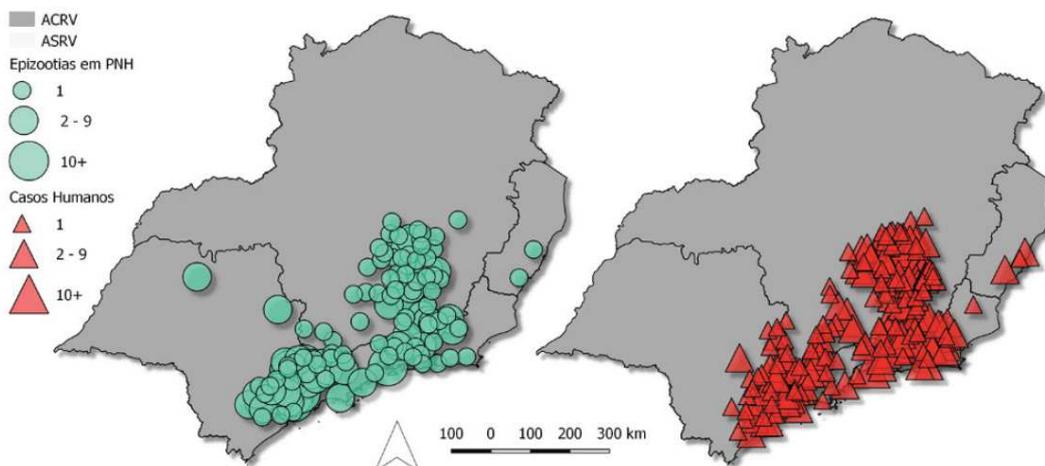
**FIGURA 1** – Série histórica do número de casos humanos confirmados para febre amarela e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, 1980 a maio de 2018.



Fonte: SVS/MS, 2018

Em 2016/2017 foram confirmados 779 casos com 262 óbitos, já em 2017/2018, foram 1.376 casos confirmados com 483 óbitos, sendo a região sudeste a mais afetada (Figura 2) (SVS, 2018). Esse aumento do número de casos pode estar relacionado a alguns fatores como uma baixa cobertura vacinal e a circulação do vírus em regiões onde ele não era encontrado (LITVOC *et al.*, 2018).

**FIGURA 2** – Distribuição dos casos humanos e epizootias confirmadas para febre amarela na região Sudeste, entre julho/17 e junho/18.



Fonte: CGDT/DEVIT/SVS/MS. Os pontos no mapa estão plotados no centroide do município e não georreferenciados no local de ocorrência do evento.

Fonte: SVS/MS, 2018

A melhor forma de prevenção da febre amarela é a vacinação de pessoas em áreas de risco e de pessoas que visitarão essas áreas. A vacina foi desenvolvida pela Fundação Rockefeller na década de 30 e no Brasil começou a ser produzida em 1937 pelo Instituto Oswaldo Cruz, e no mesmo ano já foi usada para controlar uma epidemia em Varginha, Minas Gerais. Em 1994 a vacina entrou no calendário básico de vacinação (SVS/MS, 2004).

É importante que a cobertura vacinal seja superior a 80% da população local para impedir a transmissão da doença. A vacina é segura, barata, eficiente e somente 0,4% das pessoas tem alguma complicação relacionada a ela (WHO, 2017). A OMS preconiza que 1 dose é suficiente para proteger o indivíduo pela vida toda. Há muita controvérsia sobre o número de doses e diluição da mesma, mais estudos estão sendo realizados para esclarecer a real proteção e tempo de duração da vacina (ROUKENS *et al.*, 2018).

Outra forma de controle importante da FA no continente africano seria o controle vetorial do *Ae. aegypti* (WHO, 2018). No Brasil, como mencionado anteriormente, não há relatos recentes de transmissão de YFV pelo *Ae. aegypti*. No entanto o controle de vetores silvestres através da utilização de inseticidas nas matas, por exemplo, poderia causar danos a diversas espécies que compartilham o mesmo ambiente que os mosquitos.

### **1.2.2 Outras arboviroses**

Além da febre amarela, o Brasil vem enfrentando surtos de outras arboviroses a mais de 30 anos, sendo a dengue aquela que vem apresentando o maior número de casos anualmente (SVS/MS, 2018). Entre 2017 e 2018 o país registrou 145.137 casos confirmados de dengue com 304 óbitos (SVS/MS, 2018). O vírus apresenta quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4) circulando no Brasil, sendo que o DENV-2 é o sorotipo com maior prevalência no país e parece ser o que causa mais formas graves da doença. As formas mais graves podem se manifestar de duas formas (dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue) que podem evoluir pra óbito. A maioria dos casos de dengue são da forma branda da doença, na qual o paciente se livra da infecção naturalmente, necessitando apenas terapia de reidratação (oral ou venosa) (HUANG *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2014).

Uma outra arbovirose que foi introduzida no país nos últimos anos e vem causando sérios problemas de saúde pública é a Zika. Entre 2017 e 2018 o país

confirmou 3.308 casos da doença (SVS/MS, 2018). Acreditava-se ser uma doença branda e autolimitante, porém atualmente, após a epidemia de 2015 no Nordeste brasileiro, sabe-se que a infecção por ZIKV, principalmente no primeiro trimestre gestacional promove graves alterações fetais como a microcefalia, e pode desencadear a síndrome de Guillain-Barré em adultos (MEHTA *et al.*, 2018; MOORE *et al.*, 2018).

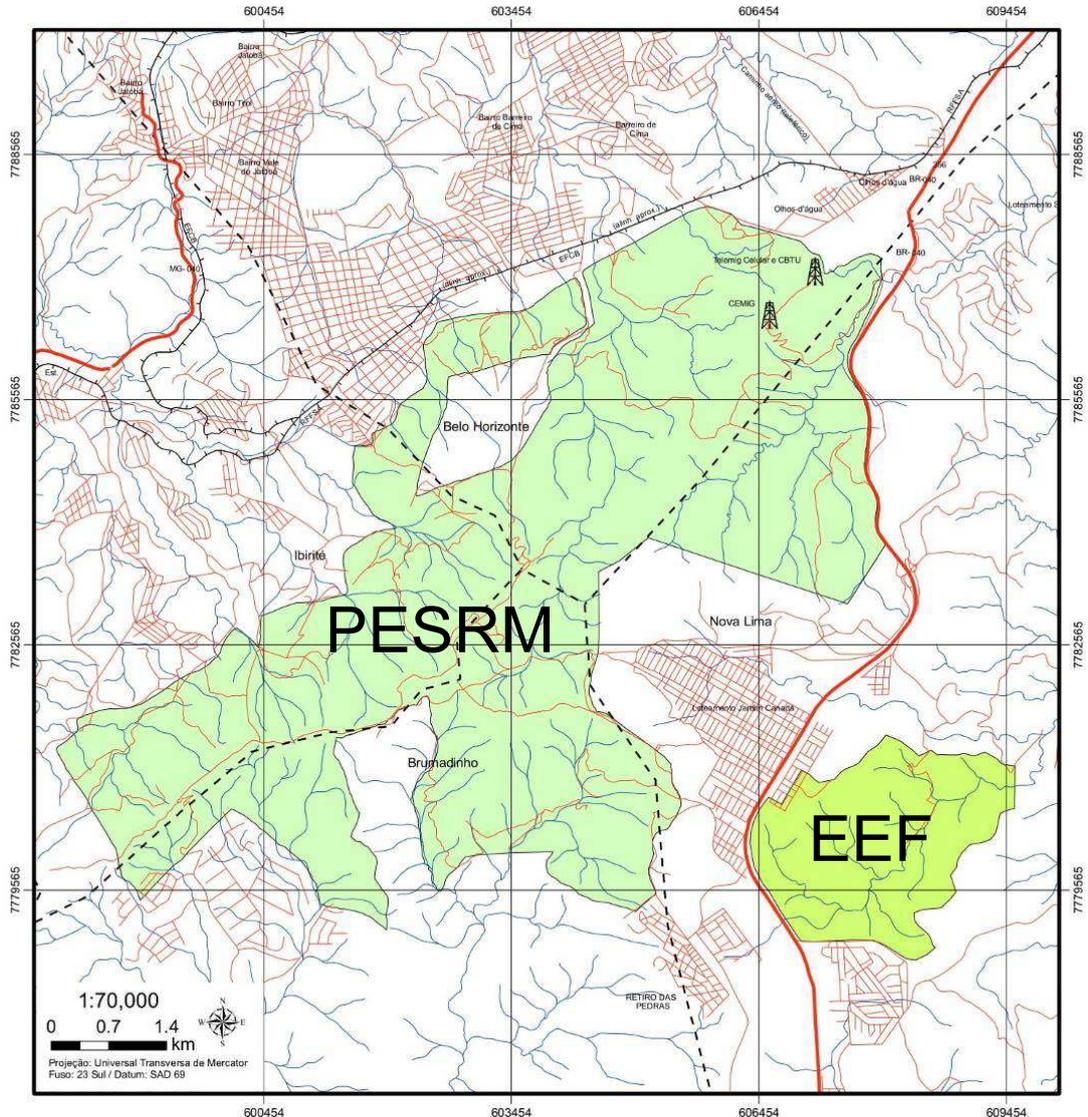
A febre do chikungunya é outra arbovirose que tem sido notificada com frequência no país. Foram confirmados 61.625 casos no ano de 2018 (SVS/MS, 2018). A febre do chikungunya é uma doença aparentemente branda com sintomas parecidos aos das outras arboviroses, mas que pode evoluir para inflamações crônicas nas articulações, durando meses e debilitando o paciente (GOULD *et al.*, 2017).

Por último, mais uma arbovirose que vem chamando a atenção é a febre mayaro, que apesar de ter a maioria dos casos registrados na região norte do Brasil, onde é endêmico, tem sido detectado em outras regiões do país (ZUCHI *et al.*, 2014). Diferentemente das outras arboviroses citadas, que tem o *Ae. aegypti* como principal vetor, os mosquitos do gênero *Haemagogus* são os principais vetores dessa doença. A maior preocupação em relação a doença é a adaptação do vírus do mayaro (MAYV) a vetores urbanos, o que facilitaria a dispersão da doença e o aumento do número de casos (LOPES *et al.*, 2014).

### **1.3 Áreas de estudo**

O Parque Estadual da Serra do Rola-Moça (PESRM) e a Estação Ecológica de Fechos (EEF) estão localizados na região metropolitana de Belo Horizonte e foram criados em 1994 para proteger os mananciais que abastecem parte da população dessa região, assim como proteger o habitat natural de espécies da fauna e flora ameaçadas de extinção, algumas endêmicas (IEF, 2007). Essas áreas estão inseridas em quatro municípios: Belo Horizonte, Brumadinho, Ibirité e Nova Lima, fazendo divisa com áreas urbanizadas como o bairro Jardim Canadá em Nova Lima e a Regional do Barreiro em Belo Horizonte (Figura 3) (IEF, 2007).

**FIGURA 3** - Mapa de localização e acessos ao Parque Estadual da Serra do Rola-Moça (PESRM) e da Estação Ecológica de Fecho (EEF).



Fonte: IEF, 2007.

A região onde está inserido o PESRM sofreu forte antropização antes de sua criação em 1994, com atividades de mineração, pastos e ocupação humana. Hoje, o parque ainda enfrenta problemas como queimadas clandestinas, despejo de lixo e ocupação ilegal. As áreas mais conservadas são as próximas aos mananciais, já que são de acesso restrito aos funcionários da COPASA (Companhia de Saneamento de Minas Gerais) e do IEF (Instituto Estadual de Florestas), e outros segmentos da população com visitação supervisionada e sujeita a autorização (IEF, 2007).

O PESRM tem seis mananciais (Catarina, Mutuca, Barreiro, Bálsamo, Rola-Moça e Taboões) que abastecem 500 mil pessoas da região metropolitana de Belo

Horizonte. Em 1982 os mananciais foram declarados pelo governo estadual como Áreas de Proteção Especial (APE), administradas pela COPASA. A EEF, administrada pela gerência do PESRM, protege o manancial do ribeirão dos Fechos (IEF, 2007).

O clima na região é tipicamente tropical, apresentando um período chuvoso entre setembro e abril, e um período de seca com precipitações isoladas de maio a agosto. O relevo é formado pela junção das Serras da Moeda e do Curral. Ambas fazem parte do Quadrilátero Ferrífero e da porção sul da Serra do Espinhaço (IEF, 2007).

A região do PESRM situa-se em área de transição entre a mata atlântica e o cerrado. A área possui apenas uma tipologia de mata atlântica, denominada floresta estacional semidecidual, e quatro tipologias diferentes de cerrado: savana arborizada (também conhecida como cerrado *sensu strictu*), cerradão, savana parque e savana gramíneo-lenhosa (IEF, 2007). Parte da savana gramíneo-lenhosa na região está associada à canga, sendo denominado campo rupestre ferruginoso (RIZZINI, 1979).

As duas áreas estudadas passaram por pressões antrópicas que ocasionaram a fragmentação dos habitats, diminuindo as populações de diversas espécies da fauna. Por estarem inseridas em uma região de transição da mata atlântica para o cerrado, nestas áreas são encontradas espécies dos dois conjuntos vegetacionais, com um predomínio de espécies típicas da mata atlântica (IEF, 2007).

A entomofauna da região é bem rica e apresenta espécies raras e algumas abelhas endêmicas ameaçadas de extinção. Porém, não há estudos sobre a diversidade de mosquitos, já que na elaboração do plano de manejo os pesquisadores contemplaram somente a ordem Hymenoptera e Coleoptera (IEF, 2007).

#### **1.4 Justificativa**

As áreas onde o trabalho foi realizado são remanescentes de mata atlântica protegidos por lei na região metropolitana de Belo Horizonte, região que por sua vez, está em constante expansão e antropização. Ao longo dos anos o entorno das duas áreas de conservação, que antes eram preservadas, deram local para empreendimentos imobiliários de luxo e para minas de minério de ferro. Apesar do lado positivo de se preservar grandes áreas naturais de importância ecológica, é

necessária atenção quanto a doenças que apresentam ciclos silvestres que podem ocasionar surtos em populações humanas.

Uma das estratégias de vigilância, é justamente a coleta de mosquitos para detecção de vírus de interesse nesses insetos, para que medidas direcionadas sejam tomadas antes do início de surto das doenças. Outro ponto importante é a falta de levantamento de espécies de mosquito na região, portanto não é sabido se existe a presença de vetores de importância para saúde pública nestas áreas estudadas.

Neste trabalho, além do estudo da fauna de mosquitos do Parque do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos, foi avaliada a presença do vírus da febre amarela (YFV), dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e mayaro (MAYV) nos mosquitos coletados. O projeto foi elaborado devido aos recentes surtos de febre amarela na região metropolitana de Belo Horizonte, e a escassez de trabalhos sobre a diversidade de culicídeos nas áreas citadas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar a fauna de culicídeos do Parque da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos, avaliando a presença de arbovírus de importância médica nos mosquitos coletados.

### **2.2 Objetivos específicos**

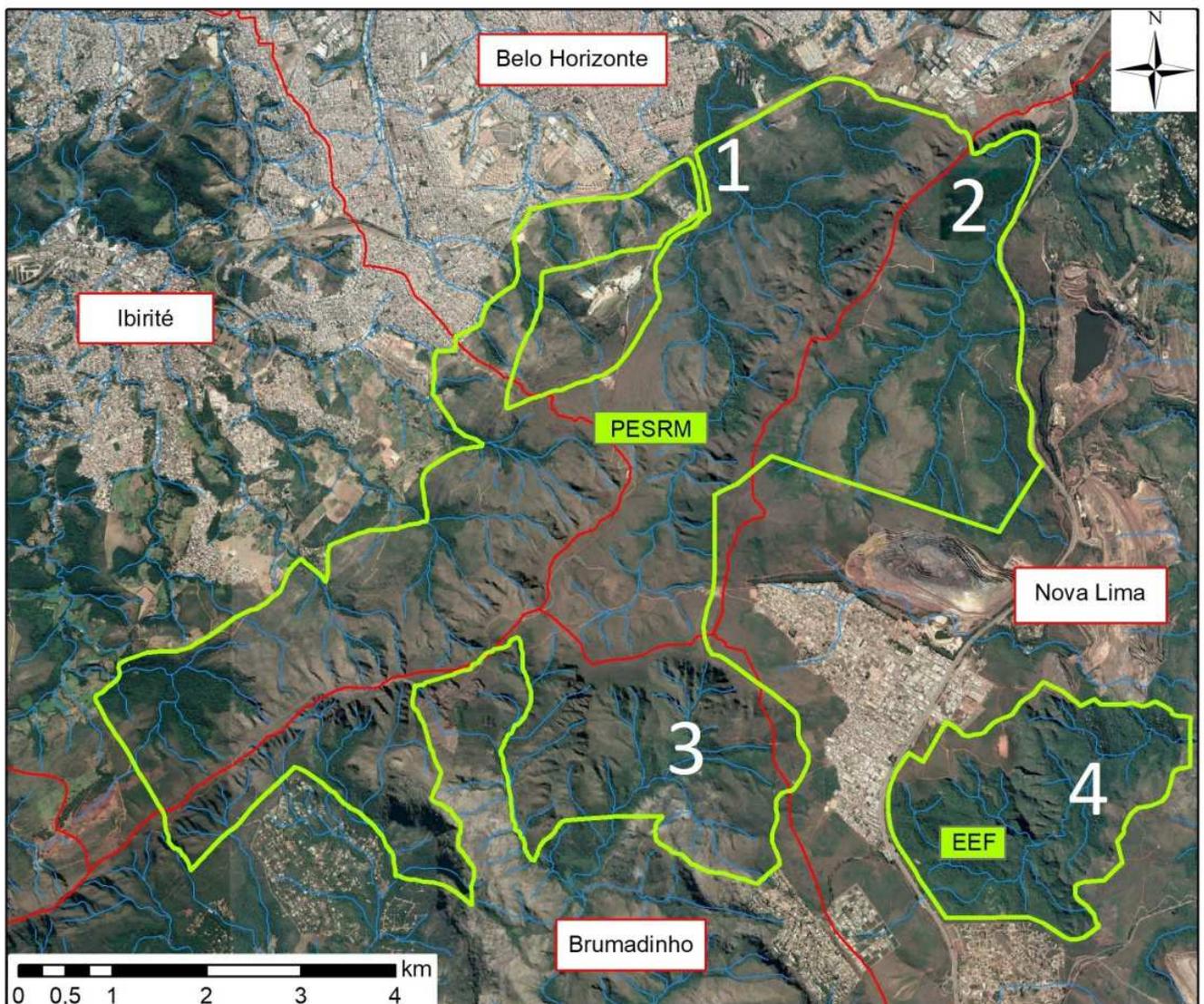
1. Descrever a fauna de culicídeos coletados no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos;
2. Avaliar a presença do genoma do vírus da febre amarela, chikungunya, mayaro, Zika e dengue YFV, CHIKV nos mosquitos coletados;
3. Confirmar a presença dos vírus detectados por RT-PCR por multiplicação em cultura de células.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Pontos de coleta

Com base em uma coleta piloto, foram selecionados três pontos para coleta de mosquitos no PESRM e um ponto na EEF (Figura 4). Estes quatro pontos foram selecionados por estarem em área de mata com pouca incidência de vento, próximos a cursos d'água e com proximidade de áreas habitadas. Os pontos estão inseridos em APÉs onde há captação de água para abastecimento. Todos os pontos foram marcados com GPS.

**FIGURA 4** - Pontos de coleta de mosquitos no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos. Linhas vermelhas: divisa dos municípios; Linhas azuis: cursos d'água; Linhas verdes: limite das áreas de conservação



Fonte: Adaptado de IEF (2007) com imagens de satélite do Google Earth Nov/2018.

O ponto 1 ( $44^{\circ}00'00''$  W,  $20^{\circ}00'12''$  S) está localizado dentro da APE do Barreiro no PESRM. É a região menos conservada, e está bem próxima a área urbana, apresentando algumas espécies vegetais exóticas, e mata secundária. Este ponto foi escolhido por estar mais próximo a área urbana, localizado cerca de 150 metros da regional do Barreiro na cidade de Belo Horizonte (Figura 5).

**FIGURA 5** - Ponto de coleta na Área de Proteção Especial do Barreiro no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça.



Fonte: Google Earth (2019) e autor.

O ponto 2 ( $43^{\circ}58'12''$  W,  $20^{\circ}00'47''$  S) está inserido no APE Mutuca no PESRM, localizado a cerca de 1 km de uma área que compreende seis condomínios no município de Nova Lima. A área consiste de mata secundária com córrego pequeno bem próximo. Neste ponto foi observado, durante as coletas, a presença de micos (*Callithrix* sp.) e muitas espécies de aves (Figura 6).

**FIGURA 6** - Ponto de coleta na Área de Proteção Especial do Mutuca no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça.



Fonte: Google Earth (2019) e autor.

O ponto 3 ( $44^{\circ}00'02''$  W,  $20^{\circ}04'05''$  S) está localizado a 1,5 km do bairro Jardim Canadá no município de Nova Lima, e a 3 km do distrito de Casa Branca em Brumadinho e dentro do APE Catarina no PESRM. É uma área com relevo bastante inclinado, e com mata secundária que enfrentou diversos incêndios nos últimos 10 anos, apesar disso, apresenta árvores de grande porte. Por ser uma área de captação de água, apresenta uma barragem com grande volume de água armazenado com pouco movimento (Figura 7).

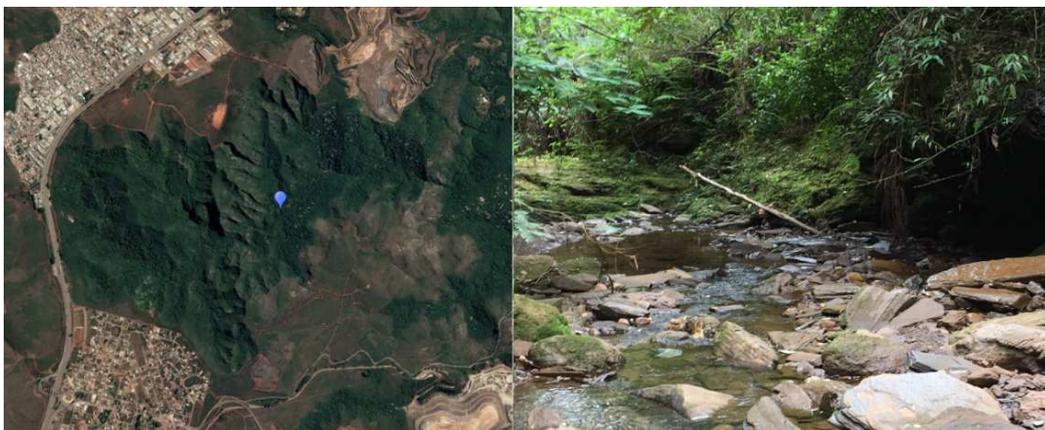
**FIGURA 7** - Ponto de coleta na Área de Proteção Especial Catarina no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça.



Fonte: Google Earth (2019) e autor.

A área onde está localizado o ponto 4 ( $43^{\circ}57'53''$  W,  $20^{\circ}04'21''$  S) encontra-se dentro da APE Fechos, na EEF. Este ponto foi selecionado por estar próximo a condomínios residenciais da cidade de Nova Lima, mas que difere do ponto 2 por apresentar maior área de mata. Durante uma das coletas foi observada pegadas de mamíferos de grande porte, assim como foram avistadas pelo menos 5 espécies de aves silvestres (Figura 8).

**FIGURA 8** - Ponto de coleta no Área de Proteção Especial de Fechos na Estação Ecológica de Fechos.



Fonte: Google Earth (2019) e autor.

### 3.2. Coletas e identificação dos mosquitos

As coletas de mosquito foram realizadas nos meses de setembro e dezembro de 2017 e fevereiro, março e maio de 2018, abrangendo assim as quatro estações do ano. Devido a problemas operacionais a coleta de fevereiro foi repetida em março. As coletas diurnas foram realizadas no período da tarde (4 horas de duração), com capturador de castro, capturadores automáticos, puçá e armadilhas automáticas CDC modelo HP (PUGEDO *et al.*, 2005), com iscas de CO<sub>2</sub> (gelo seco) (Figura 9). As coletas noturnas (12 horas de duração) foram realizadas apenas com armadilhas automáticas com isca de luz e CO<sub>2</sub>, sendo retiradas na manhã seguinte. Quatro armadilhas foram usadas por ponto, duas em cada turno, todas colocadas à aproximadamente 1,5 m de altura do solo.

FIGURA 9 – Métodos de coleta: armadilha automática modelo HP com isca de CO<sub>2</sub> (a). Capturador automático (b).



Fonte: autor.

Durante as coletas, as condições climáticas (temperatura e umidade) foram registradas utilizando termohigrômetro (Cotronic Technology) calibrado e verificado. Em todas as coletas os mosquitos foram colocados individualmente em tubos de tampa de rosca (Sarstedt) e acondicionados em gelo seco (para preservar o RNA viral) até serem levados para o laboratório, onde foram armazenados no freezer -80 °C.

A primeira excursão para coleta dos mosquitos teve o objetivo de realizar um levantamento prévio detalhado da fauna. Desta forma, os mosquitos coletados foram montados em alfinetes entomológicos e identificados até nível de espécie ou gênero

de acordo com classificação proposta por HARBACH & KITCHING (1998). Foram usadas chaves de identificação de rotina da Coleção de Mosquitos Neotropicais (CMN) do Instituto René Rachou (IRR). Estes exemplares serviram como referência para acelerar o processo de identificação dos mosquitos coletados nas demais excursões de campo, visando conservar as possíveis partículas virais presentes nos mosquitos. Espécies que não foram amostradas na primeira coleta foram descongeladas e então montadas para servirem de referência para as demais identificações. Ao final do trabalho, 89 mosquitos montados foram depositados na CMN.

### 3.3. Detecção de arbovírus

Os mosquitos foram macerados individualmente por 1 minuto e 30 segundos em um mini beadbeater machine (Biospecproducts) em tubos contendo *beads* de vidro (Sigma) e 150 µL de PBS. A extração de RNA foi feita com 50 µL do macerado de mosquito (1/3 do material obtido) adicionado a 50 µL de uma solução de lise denominada de *squash buffer* [Tris 99% (Inlab) cloreto de sódio (Synth), EDTA (Synth)] e adicionado 0,6 µL de Proteinase K (Qiagen) em placas de PCR Hard-Shell® 96-Well PCR (BioRad). As placas de PCR foram aquecidas em termociclador (Applied) a 56 °C por 5 minutos, seguido por 98 °C por 15 minutos, e armazenados a 12 °C até a realização da PCR (DUTRA *et al.*, 2017).

A detecção de RNA viral nos mosquitos foi realizada por PCR quantitativa (RT-qPCR) usando o reagente tipo *master mix* denominado Gotaq® Probe 1-step RT-qPCR System (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. As reações do tipo *multiplex* foram feitas utilizando os *iniciadores* e sondas descritos na tabela 1.

TABELA 1 - Sequência de primers e sonda utilizados no RT-qPCR.

Vírus	Sequência	Referência
YFV	F-5'/GCT AAT TGA GGT GYA TTG GTC TGC /3' R-5'/CTG CTA ATC GCT CAA MGA ACG/3' S-5'/FAM/ATC GAG TTG /ZEN/ CTA GGC AAT AAA CAC/3IAbRQSp/3'	DOMINGO <i>et al.</i> , 2012
CHIK	F-5'/AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G/3' R-5'/CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT/3' S-5'/5HEX/CCA ATG TCY/ZEN/TCM GCC TGG ACA CCT TT / 3IABkFQ/3'	PASTORINO <i>et al.</i> , 2005
DENV	F-5'/GGA AGC TGT ACC TTG GTG GTA AGG A/3' R-5'/CGT TCT GTG CCT GGA ATG ATG/3' S-5'/TEX615/AAC AGC ATA TTG ACG CTG GGA GAG ACC AGA /3IAbRQSp/3'	PACIDÔNIO <i>et al.</i> , 2017 com modificações
ZIKV	F-5'/TTG GTC ATG ATA CTG CTG ATT GC/3' R-5'/CCT TCC ACA AAG TCC CTA TTG C/3' S-5'/FAM/CGG CAT ACA /ZEN/ GCA TCA GGT GCA TAG GAG /3IABKfQ/3'	LANCIOTTI <i>et al.</i> , 2008
MAYV	F-5'/GTG GTC GCA CAG TGA ATC TTT C/3' R-5'/CAA ATG TCC ACC AGG CGA AG/3' S-5'/HEX/ATG GTG GTA /ZEN/ GGC TAT CCG ACA GGT C/3IABKfQ/3'	LONG <i>et al.</i> , 2011

F = forward primer, R = reverse primer e S = sonda

As reações *multiplex* tiveram como alvo YFV, CHIKV e DENV na primeira reação e ZIKV e MAYV na segunda. Foi usada ciclagem padrão no equipamento Lightcycler96 (Roche): transcrição reversa a 45 °C por 15 minutos, inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA Polimerase da Gotaq® a 95 °C por 2 minutos e desnaturação, anelamento e extensão em 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, seguido de 60 °C por 1 minuto.

O volume da reação foi de 10 µL: 2× RT-PCR *Reaction Mix* (Promega), *RT-enzyme solution* (Promega), 1 µM do *primer* de YFV (For + Rev) (IDT), 0,2 µM da sonda de YFV (IDT), 0,5 µM dos outros *primers* (IDT) e 0,1 µM das outras sondas (IDT). A fração de (1/40) do RNA total extraído foi utilizada nas reações. O controle positivo usado foi um fragmento de gene YFV obtido através de clonagem plasmideal (plasmídeo pGemP da Promega).

### 3.4. Multiplicação viral em cultura de células

Todas as amostras positivas para YFV foram selecionadas para cultivo viral. O restante do material macerado, que não foi usado na PCR, cerca de 100 µL que estava armazenado a -80 °C (macerado em PBS 1X), foi centrifugado por 2 minutos à 4000 g. Foram recolhidos 20 µL da parte superior do sobrenadante e inoculado em garrafas T 25cm<sup>2</sup> (Sarstedt) preparadas com cultura de células C6/36 de *Aedes albopictus* ( $2 \times 10^6$  células por garrafa) para comprovar a multiplicação viral. A adsorção foi feita durante 1 hora em estufa à 28 °C. Ao final da adsorção foram adicionados 5 mL de meio Leibovitz 15 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco) e *Penicillin Streptomycin* (Pen Strep) (Gibco) à 10 µg/mL. As garrafas foram mantidas por até 10 dias em estufa à 28 °C.

As garrafas foram observadas a cada 2 dias para verificar a presença de contaminantes como fungos e bactérias, além de tentar verificar a presença de efeito citopático causado pelo YFV. Foram coletadas, individualmente, amostras do sobrenadante das garrafas após 7 e 10 dias de inoculação. O RNA foi extraído usando a mesma metodologia descrita anteriormente (*Squash buffer*). Posteriormente foi realizada a RT-PCR quantitativa para YFV com os *primers* descritos na tabela 1, desta vez em uma reação apenas para YFV (*singleplex*), para confirmar multiplicação viral das 13 amostras positivas.

A quantificação do número de cópias de YFV foi realizada em comparação com uma curva padrão utilizando um fragmento de gene YFV, a mesma sequência do fragmento usado como controle positivo nas RT-PCRs, obtido também através de clonagem plasmideal (plasmídeo pGemP da Promega). Na realização da RT-PCR das amostras, foram adicionadas cinco diferentes concentrações da curva padrão e desta forma foi possível quantificar as amostras obtidas na cultura de células. Como controle negativo foi coletada uma amostra de garrafa que só continha células C6/36 (*Mock*) preparada no mesmo dia das outras garrafas.

### **3.5. Análise dos dados**

Os gráficos foram feitos utilizando o Prism (Graphpad Version 7.04). A taxa de infecção por espécie e por área de coleta foi calculada dividindo-se o número de mosquitos positivos pelo número total de mosquitos da mesma espécie coletados na mesma área, e a taxa de infecção total por espécie foi calculada dividindo o número de exemplares infectados da espécie pelo número total de exemplares daquela mesma espécie.

### **3.6. Licenças**

Licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para coleta de mosquitos: nº 57712-1. Licença do Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF/MG) para pesquisa em Unidade de conservação estadual: nº 046/2017. Número de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) para acesso ao patrimônio genético nº A72F743 e AC07198. Cópias das autorizações e do cadastro são apresentadas no anexo.

#### 4. RESULTADOS

867 mosquitos foram coletados, deste total 89 foram montados para auxiliar na identificação das espécies e 778 foram congelados e processados para a detecção de RNA viral. No total foram capturadas 20 espécies que compreenderam 10 gêneros. Apenas um espécime do sexo masculino foi coletado (*Culex (Melanoconion) sp.*).

Na tabela 2 é apresentado o número de espécimes coletados por área e por método de coleta utilizado. A grande maioria dos espécimes (n=658, 76%) foram coletados através de busca ativa (Capturador de castro, puçá ou capturador automático). Em relação aos pontos de coleta, o Ponto 1 (APE Barreiro) foi o com mais indivíduos coletados (n= 553, 63,8%) e o ponto 4 (APE Fechos) o com menor número de indivíduos (n=56, 6,5%).

**TABELA 2** – Número de mosquitos coletados por ponto e por método de coleta no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos.

Ponto de coleta	Coleta manual	Armadilhas HP	Total
Ponto 1 (APE Barreiro)	406	147	553 (63,8%)
Ponto 2 (APE Mutuca)	94	33	127 (14,6%)
Ponto 3 (APE Catarina)	115	16	131 (15,1%)
Ponto 4 (APE Fechos)	43	13	56 (6,5%)
<b>Total</b>	<b>658 (76%)</b>	<b>209 (24%)</b>	<b>867 (100%)</b>

Em relação a diversidade, o ponto com maior número de espécies foi o ponto 1, com 18 espécies diferentes. Ponto 2 e 4 tiveram 12 espécies coletadas e ponto 3 apresentou uma diversidade de 13 espécies. Somente 4 espécies foram comuns para todos os pontos: *Haemagogus janthinomys* (Figura 10c), *Haemagogus leucocelaenus* (Figura 10d) *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (von Humboldt, 1819) (Figura 10b) e *Sabethes (Sabethes) purpureus* (Theobald, 1907) (Figura 10f).

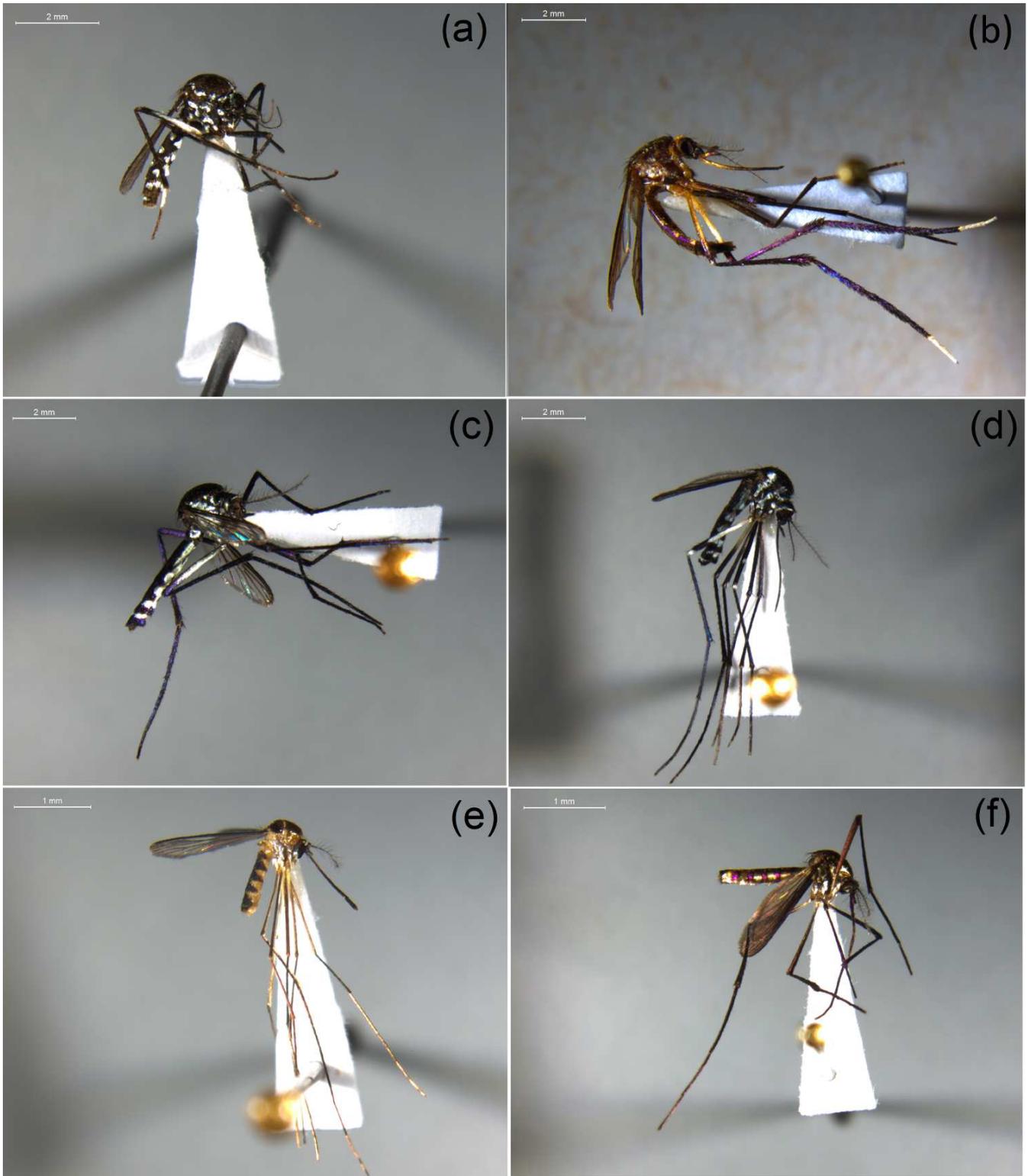
A espécie mais abundante foi *Psorophora ferox* com 271 espécimes; que corresponde a 31,3% do total coletado, seguida por *Limatus durhamii* Theobald, 1901 (Figura 10e) com 166 (19,1%), *Haemagogus janthinomys* com 158 (18,2%) e *Aedes (Ochlerotatus) serratus* (Theobald, 1901), com 97 espécimes coletados (11,2%). Na tabela 3 estão descritas as espécies coletadas, o número de indivíduos por espécie e a porcentagem que representam do total coletado.

**TABELA 3** – Número de mosquitos coletados por espécie, entre setembro de 2017 e maio de 2018 no Parque Estadual da Serra do Rola-Moça e Estação Ecológica de Fechos.

Categoria Taxonômica	Set	Dez	Fev/Mar	Mai	Total
<i>Psorophora ferox</i>	0	25	243	3	271 (31,3%)
<i>Limatus durhamii</i>	7	36	118	5	166 (19,1%)
<i>Haemagogus janthinomys</i>	0	77	81	0	158 (18,2%)
<i>Aedes serratus</i>	0	53	43	1	97 (11,2%)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	0	24	18	0	42 (4,8%)
<i>Culex (Anoediopora) sp</i>	30	0	0	0	30 (3,5%)
<i>Sabethes purpureus</i>	6	4	12	2	24 (2,8%)
<i>Aedes albopictus</i>	0	8	8	0	16 (1,8%)
<i>Sabethes petrocchiaie</i>	0	2	7	5	14 (1,6%)
<i>Aedes terreus</i>	0	10	0	0	10 (1,2%)
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	2	2	0	1	5 (0,6%)
<i>Culex sp</i>	0	4	1	0	5 (0,6%)
<i>Culex (Culex) sp</i>	0	1	1	2	4 (0,5%)
<i>Culex (Melanoconion) sp</i>	1	0	1	2	4 (0,5%)
<i>Sabethes albiprivus</i>	2	0	2	0	4 (0,5%)
<i>Aedes fluviatilis</i>	0	0	2	0	2 (0,2%)
<i>Culex (Microculex) sp</i>	0	0	2	0	2 (0,2%)
<i>Psorophora albigenu</i>	0	2	0	0	2 (0,2%)
<i>Runchomyia cerqueirai</i>	2	0	0	0	2 (0,2%)
<i>Wyeomyia fuscipes</i>	2	0	0	0	2 (0,2%)
<i>Wyeomyia moerbista</i>	0	0	2	0	2 (0,2%)
<i>Anopheles eiseni</i>	1	0	0	0	1 (0,1%)
<i>Culex declarator</i>	0	0	1	0	1 (0,1%)
<i>Runchomyia reversa</i>	0	1	0	0	1 (0,1%)
<i>Wyeomyia alani</i>	0	0	1	0	1 (0,1%)
<i>Wyeomyia sp</i>	0	0	1	0	1 (0,1%)
<b>Total</b>	<b>53 (6,1%)</b>	<b>249 (28,7%)</b>	<b>544 (62,7%)</b>	<b>21 (2,4%)</b>	<b>867 (100%)</b>

Entre as espécies raras (pouco coletadas em levantamentos em Minas Gerais) podemos citar as espécies dos gêneros *Runchomyia* e *Wyeomyia* que tiveram juntos 9 espécimes coletados. Foram feitas imagens de algumas espécies, mostradas na figura 10.

**FIGURA 10** - Principais espécies capturadas: **(a)** *Aedes albopictus*. **(b)** *Psorophora. ferox* **(c)** *Haemagogus janthinomys*. **(d)** *Haemagogus. leucocelaenus* **(e)** *Limatus durhamii*. **(f)** *Sabethes purpureus*.



**Fonte:** Imagens obtidas em estereomicroscópio M205C (Leica) com sistema de captura de imagem com câmera DMC2900 (Leica).

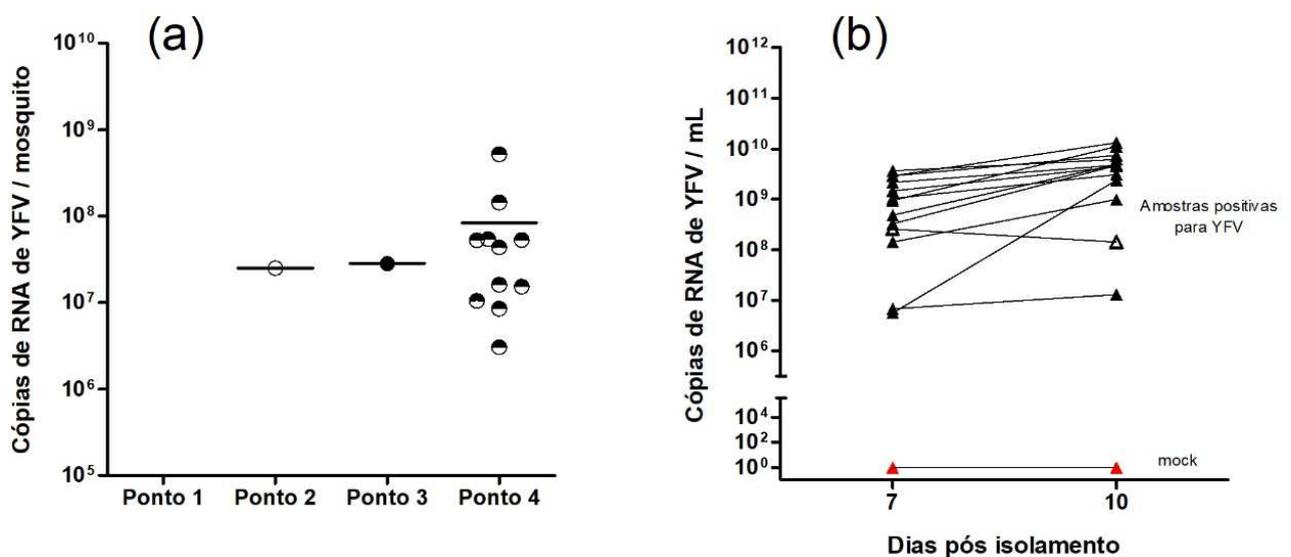
Após a realização das análises moleculares dos 778 mosquitos, foram encontrados 13 espécimes positivos para YFV, sendo todos da espécie *Haemagogus janthinomys*. Dos mosquitos positivos, 11 foram coletados no mesmo dia, 29 de janeiro de 2018, e local (Ponto 4). Os outros dois mosquitos positivos foram coletados em dezembro de 2017 em áreas distintas (Pontos 2 e 3). É apresentado abaixo a taxa de infecção absoluta nas áreas amostradas (Tabela 4).

TABELA 4 -Taxa de infecção por YFV em *Haemagogus janthinomys*.

	<i>Hg. janthinomys</i> infectados	Taxa de infecção
Ponto 1	0/13	0%
Ponto 2	1/11	9,9%
Ponto 3	1/109	0,9%
Ponto 4	11/25	44%
Total	13/158	8,2%

Além da análise da presença de vírus nos mosquitos foi realizada a quantificação absoluta de carga viral através de curva padrão. Os resultados dessa quantificação podem ser vistos no gráfico 1a. Os mosquitos positivos apresentaram em média  $7,54 \times 10^7$  cópias de RNA de YFV. Em nenhum dos mosquitos coletados foi encontrada a presença de RNA dos outros arbovírus testados (DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV).

GRÁFICO 1 - (a): Quantificação de RNA de YFV por mosquito (*Hg. janthinomys*). (b): Quantificação de RNA de YFV por amostra sobrenadante de cultura em 7 e 10 dias pós inoculação.



Todas as amostras positivas para YFV no *screening* primário para presença de RNA viral inoculadas em cultura de célula foram confirmadas pela técnica de RT-qPCR. A quantidade de cópias de RNA viral por mL obtidas em 7 e 10 dias pós isolamento estão descritas no gráfico 1b. A quantificação variou de  $10^6$  a  $10^8$  cópias de RNA viral por mL. Das treze amostras isoladas, doze apresentaram aumento da quantidade detectada, isto indica um perfil de replicação viral após 10 dias se comparado com 7 dias. Somente uma amostra não apresentou crescimento positivo no décimo dia em comparação com o sétimo dia.

O isolamento indicou que as partículas virais eram ativas e infectivas. Como controle negativo o mesmo protocolo foi realizado com células C6/36 somente com o meio Leibovitz 15 (Mock). Como esperado, não foi detectado YFV nesta amostra (Mock), garantindo que as partículas de vírus coletadas no sobrenadante das amostras de mosquitos não foram oriundas de contaminação laboratorial.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostram o perfil da fauna dos locais amostrados, avalia o sucesso dos métodos de coleta selecionados para trabalho e as taxas de infecção por arbovírus encontradas nos mosquitos coletados nas áreas de conservação.

O perfil da fauna de mosquitos capturados no PESRM e na EEF foi condizente com o trabalho de Neves & da Silva (1973), que realizou capturas no Parque municipal dos Mangabeiras em Belo Horizonte. Este parque apresenta os mesmos tipos de solo, clima e vegetação das áreas deste estudo, e estão próximas e conectadas por corredores ecológicos.

A principal diferença entre os trabalhos foi a diversidade de espécies de anofelinos capturados no trabalho anterior, sete espécies contra apenas uma neste trabalho (*Anopheles (Anopheles) eiseni* Coquillet, 1902). Isso pode ser explicado pelo tipo de metodologias de coleta utilizadas no trabalho de Neves, que fez coletas usando armadilhas de Shannon no período noturno, conhecido como melhor método para coleta de anofelinos, uma vez que a maioria é de hábito noturno (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994).

Dos 867 mosquitos coletados neste trabalho, apenas 209 (24%) foram coletados utilizando armadilhas automáticas, apesar destas ficarem expostas por mais tempo. Estes números sugerem que mais estudos são necessários para o desenvolvimento de armadilhas mais eficazes, tendo em vista a necessidade de se otimizar os trabalhos de vigilância entomológica.

A grande diferença entre o número de espécimes coletados no Ponto 1 (n=553; 63,8%) e nos outros pontos, pode ser explicado devido a sobreposição de habitats, pois o ponto 1 é o único que, apesar de ter grande área de mata, fica próximo à área urbana, além de ser uma região bem antropizada, de mata secundária. Esta mescla de ambientes propicia tanto a proliferação de espécies mais adaptadas ao ambiente peri-urbano como *Ps. ferox* e *Ae. serratus*, assim como espécies tipicamente silvestres como o *Li. durhamii* e o *Sa. purpureus* (FORATTINI, 2002).

A taxa absoluta de infecção dos *Hg. janthinomys* foi de 8,2%, número similar ao MIR (*minimum infection rate*) encontrado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, por Dégallier *et al.* (1992) que foi de 6,54% para a mesma espécie. Neste

estudo, as coletas de mosquitos foram realizadas durante ou logo após casos reportados de FA, assim como no presente trabalho.

Apesar de terem sido coletadas três espécies do gênero *Sabethes*, não foi detectada infecção por YFV em nenhuma delas. Das espécies de *Sabethes* coletadas somente *Sa. albiprivus* já foi encontrada infectada naturalmente por YFV na América do Sul (GOENAGA *et al.*, 2012). Além do *Sa. albiprivus*, outro vetor já conhecido de FA é o *Sa. chloropterus*. Entretanto essa espécie nunca foi encontrada naturalmente infectada no Brasil (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994; HERVÉ *et al.*, 1985), tampouco foi capturada neste trabalho. Acredita-se que mais espécies do gênero *Sabethes* tenham papel secundário na manutenção do vírus, além daquelas já incriminadas, porém mais estudos são necessários para verificar quais espécies podem ser consideradas vetores de arbovírus.

Outra espécie incriminada como vetor da FA é o *Haemagogus leucocelaenus*. Apesar de terem sido coletados 42 mosquitos desta espécie, não foi detectado RNA viral em nenhum espécime. O *Hg. leucocelaenus* é considerado o principal vetor na região sul do país (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994) e a maioria dos trabalhos recentes detectaram o YFV nesta espécie (CARDOSO *et al.*, 2010; SOUZA, *et al.*, 2011). Esta espécie é mais facilmente encontrada em áreas periurbanas, devido a sua maior capacidade de adaptação à ambientes modificados (MARCONDES & ALENCAR, 2010).

Em trabalho realizado em 2008 no sul do país foi encontrada uma taxa de infecção de 1,88% para YFV em *Ae. serratus* (CARDOSO *et al.*, 2010). Apesar de termos capturado 97 mosquitos desta espécie, nenhum apresentou positividade para YFV, tampouco para os outros arbovírus testados.

Não foi detectado DENV nem CHIKV nos mosquitos coletados, apesar das recorrentes epidemias na região metropolitana de Belo Horizonte (SMSA-BH, 2016). Estes dados corroboram a ideia de que a transmissão urbana desses dois arbovírus através da picada do *Ae. aegypti* é, por enquanto, a principal forma de transmissão dos mesmos (MOREIRA *et al.*, 2009). Apesar disso, não se pode afirmar que não haja um ciclo silvestre de dengue e chikungunya ocorrendo na região estudada.

Terzian *et al.* (2018) relataram a presença de primatas não humanos infectados naturalmente por ZIKV em Minas Gerais entre 2016 e 2017, entretanto, não foi detectado nenhuma cópia de RNA viral de ZIKV nos mosquitos coletados neste trabalho. Ainda são necessários mais estudos para incriminar os possíveis

vetores silvestres e como esse ciclo poderia estar influenciando na manutenção desse vírus em áreas próximas a grandes metrópoles.

Zuchi *et al.* (2014) detectaram a circulação de MAYV durante uma epidemia de dengue em 2011-2012 em 20 municípios de Mato Grosso. Em 2013, Serra *et al.* (2016) encontram mosquitos (*Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*) infectados com MAYV em Cuiabá também no estado do Mato Grosso. Estes dois estudos sugerem a circulação desse vírus fora da região norte do Brasil, onde é endêmico (LOPES *et al.*, 2014). Contudo, não foi detectada a presença de MAYV nos mosquitos coletados no presente trabalho. Ainda são necessários mais estudos para acompanhar e monitorar se há a circulação desse vírus em Minas Gerais e assim, diminuir o risco de possíveis surtos na região sudeste, onde ele já poderia estar circulando.

Os municípios onde foram encontrados mosquitos infectados, Nova Lima e Brumadinho, tiveram juntos, entre julho de 2017 até junho de 2018, 50 casos confirmados com 14 óbitos para FA (SES/MG, 2018). Além disso, foi registrada nessas áreas, epizootias de primatas não humanos em janeiro de 2018, em Brumadinho, e novembro de 2017 e janeiro de 2018 em Nova Lima, o que demonstra que a vigilância nessas áreas deve ser constante.

As três áreas nas quais foram isolados YFV de mosquitos (pontos 2, 3 e 4) não são tão próximas a perímetros urbanos como observado no ponto 1. Apesar disso, há seis grandes condomínios que estão conectados às áreas de estudo através de corredores ecológicos, o que permite uma fácil movimentação de mosquitos e de primatas. Importante destacar que fêmeas de *Hg. janthinomys* já foram encontradas até 11 Km de seu criadouro, o que sugere que esta espécie possui um alto poder de dispersão (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). A maioria destes condomínios está inserida dentro de grandes áreas de mata úmida, habitat ideal para a procriação e manutenção de espécies do gênero *Haemagogus* (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994).

O *Hg. janthinomys* tem se mostrado um mosquito “versátil”: depois de se alimentar em um hospedeiro infectado com YFV, após o período intrínseco da infecção, ele passa a ter capacidade de transmitir o vírus (CONSOLI; LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). Além de se manter infectivo por toda a vida, a fêmea dessa espécie tem a capacidade de colocar ovos infectados pelo vírus (transmissão transovariana) (MONDET *et al.*, 2002). Estes dois fatores contribuem para a manutenção do vírus no ambiente.

Mondet *et al.* (2002), após uma epizootia de febre amarela que matou muitos bugios próximo a Altamira no estado do Pará, em 1998, observaram um MIR de aproximadamente 3,6% para *Hg. janthinomys*. Um mês após um segundo estudo encontrou um MIR de 2,9% para fêmeas nulíparas, deixando clara a importância epidemiológica da transmissão transovariana para a manutenção do vírus na natureza.

Apesar do *Hg. janthinomys* ser considerado um mosquito acrodendrófilo, todos os 158 espécimes amostrados neste trabalho foram coletados a nível do solo. Sugere-se que a menor estatura das árvores da mata semidecidual estacional das áreas estudadas em comparação com outras tipologias da mata atlântica e da floresta amazônica, que apresentam árvores de maior estatura, facilita a descida do mosquito da copa para alimentar a nível do solo.

Atualmente uma atividade que passa a ser considerada de risco, é o ecoturismo, muito frequente na região metropolitana de Belo Horizonte, devido ao elevado número de áreas preservadas com trilhas e cachoeiras que atraem um grande número de pessoas. Portanto, aconselha-se que este tipo de atividade seja monitorada pelos órgãos competentes em áreas com controle de acesso, somente permitindo a entrada, após apresentação de cartão de vacina com a imunização para febre amarela em dia, a fim de diminuir o risco de surtos.

A vacinação, inclusive, é um ponto de suma importância para o controle da febre amarela. Sabe-se que a febre amarela é uma doença grave, com alta letalidade e que existe uma vacina eficaz disponível no SUS para qualquer cidadão dentro da área de risco da doença ou em trânsito para áreas de risco.

Em janeiro de 2017, quando os primeiros casos foram confirmados em Minas Gerais, a cobertura vacinal no estado era de 57%, bem abaixo dos 80% necessários para interromper a transmissão local (WHO, 2018). Após intensas campanhas de vacinação, em outubro de 2018, a cobertura vacinal chegou a 90% (SES/MG, 2018). Esta ação do governo foi de fundamental importância para conter o avanço da doença no estado de Minas Gerais.

O presente estudo revelou que casos de febre amarela silvestres e mosquitos infectados estão sendo reportados cada vez mais próximos a grandes áreas urbanas. Apesar de nenhum caso de febre amarela urbana ter sido reportado no Brasil desde 1942, a re-emergência desta doença ainda é um risco à saúde pública no país, tendo em vista que o *Ae. aegypti*, principal vetor do vírus em área urbana,

está distribuído em todo o país. A prevenção, principalmente através de campanhas de vacinação, é a melhor medida de controle de epidemias de febre amarela, assim como para evitar o reaparecimento da forma urbana de transmissão no país.

Programas sistemáticos de vigilância entomológica em mosquitos e em primatas não humanos são necessários e seriam muito eficazes no monitoramento da circulação do vírus. Além disso, campanhas de vacinação contínuas ajudariam a manter a cobertura vacinal sempre alta.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem o *Haemagogus janthinomys* como principal vetor responsável pelos surtos de febre amarela de 2017-2018 no vetor sul da Região Metropolitana de Belo Horizonte. 867 mosquitos foram coletados compreendendo 20 espécies dentro de 10 gêneros. Dos mosquitos coletados, somente *Hg. janthinomys* foi encontrado infectado com o vírus da febre amarela.

Não foram encontrados mosquitos infectados com os outros vírus alvo, indicando que mais estudos são necessários para elucidar possíveis ciclos silvestres de doenças como dengue e Zika. Sugere-se também que mais estudos para o aperfeiçoamento de armadilhas de coleta de mosquitos, a fim de otimizar a vigilância entomológica em áreas de risco.

Esperamos que nossos resultados possam auxiliar os órgãos de saúde nas esferas municipais e estadual na busca de um controle e manejo efetivos dessas arboviroses, com a criação de um modelo de vigilância para minimizar surtos como os ocorridos nos últimos dois anos.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR-SANTOS, A.M. *et al.* **Epidemiological assessment of neglected diseases in children: lymphatic filariasis and soil-transmitted helminthiasis.** Rio de Janeiro. *J. Pediatr.*, v. 89, n. 3, p. 250-255. 2013.
- CARDOSO, J.C.; *et al.* **Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, Southern Brazil, 2008.** *Emerg Infect Dis.*, v.16, n. 12, p. 1918–1924, 2010
- CONSOLI, A. G. B. R; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.
- Dégallier N., *et al.* **New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil.** *J Brazilian Assoc Advanc Sci*, v. 44, p. 136-142,1992.
- DOMINGO, C. *et al.* **Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories.** *J Clin Microbiol.*, v. 50, n. 12, p. 4054-60, 2012.
- DUTRA, H. L. C. *et al.* **Development and physiological effects of an artificial diet for *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti*.** *Scientific Reports*, n. 7, Article number: 15687, 2017
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**, vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
- FRANCO, O. **A história da febre amarela no Brasil**, 1ª ed.; Ministério da Saúde: Rio de Janeiro, 1969.
- GOENAGA, S. *et al.* **Isolation of Yellow Fever Virus from Mosquitoes in Misiones Province, Argentina.** *Vector Borne Zoonotic Dis.*,v. 12, n. 11, p. 986-93, 2012.
- GOLDANI, L.Z. **Yellow fever outbreak in Brazil, 2017.** *Brazilian J. Infect. Dis.*, v. 21, p. 123–124, 2017.
- GOULD, E. *et al.* **Emerging arboviruses: Why today?.** *One Health*, v. 4, p. 1-13, 2017.
- HARBACH, R. E. 2011. **Mosquito Taxonomic Inventory.** Disponível em: <<http://mosquitotaxonomic-inventory.info/family-culicidae-meigen-1818>>. Acesso em 18 de mai. 2017.
- HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. **Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera).** *Systematic Entomology*. 1998. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/229876983\\_Phylogeny\\_and\\_classification\\_of\\_the\\_Culicidae\\_Diptera](https://www.researchgate.net/publication/229876983_Phylogeny_and_classification_of_the_Culicidae_Diptera)>. Acesso em: 10 de dez. 2017.
- HERVÉ, J.P. *et al.* **A febre amarela silvestre no Brasil e os riscos de propagação urbana.** *Hiléia Médica*, v. 7, n. 1, p. 31-40, 1985.

HUANG, Y.S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D.L. **Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses.** *Front. Microbiol.*, v. 10, 22, 2019

INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS – IEF. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável – SEMAD. **Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Rola-Moça, incluindo a Estação Ecológica de Fechos,** Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <[http://www.ief.mg.gov.br/images/stories/Plano\\_de\\_Manejo/Rola\\_Moca/enc1\\_pesrm\\_eef-995.pdf](http://www.ief.mg.gov.br/images/stories/Plano_de_Manejo/Rola_Moca/enc1_pesrm_eef-995.pdf)>. Acesso em: 6 de dez. 2017.

LANCIOTTI, R.S. *et al.* **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, p. 1232–1239, 2008.

LITVOC, M.N.; NOVAES, C.T.G.; LOPES, M.I.B.F. **Yellow fever.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 64, p. 106–113, 2018.

LONG, K.C.; *et al.* **Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 85, p. 750–757, 2011.

LOPES, N.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil.** Revista Pan-Amazônica de Saúde. Pará, 2014. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v5n3/v5n3a07.pdf>>. Acesso em: 9 de dez. 2018.

MARCONDES, C.B.; ALENCAR, J. **Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera : Culicidae) do Brasil.** *Rev. Biomed.*, v. 21, p. 221–238. 2010.

MEDEIROS, A.S.; *et al.* **Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance.** *PLoS ONE*, v. 13, n. 3. e0194108, 2018.

MEHTA, R; *et al.* **The spectrum of neurological disease associated with Zika and chikungunya viruses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: A case series.** *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 12, n. 2. e0006212, 2018.

MONATH, T.P.; VASCONCELOS, P.F.C. **Yellow fever.** *J. Clin. Virol.*, v. 64, p. 160–173, 2015.

MONDET, B.; *et al.* **Isolation of Yellow Fever Virus from Nulliparous *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* in Eastern Amazonia.** *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, v. 2, p. 47–50, 2002.

MOORE, C.A.; *et al.* **Congenital Zika Syndrome: Characterizing the Pattern of Anomalies for Pediatric Healthcare Providers.** *JAMA Pediatr.*, v. 171, 3, p. 288–295, 2017.

MOREIRA, L.A. *et al.* **A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium.** *Cell*, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009

NEVES, D. P.; da SILVA, J.E. **Aspectos da biologia dos culicinae do Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte. I. Espécies locais e variação estacional.** *Arq. Esc. Vet., Belo Horizonte*, v. 25, p. 287-298, 1973

PACIDÔNIO, E.C. *et al.* **The impact of Wolbachia infection on the rate of vertical transmission of dengue virus in Brazilian *Aedes aegypti*.** *Parasites and Vectors*, v. 10, p. 1–6, 2017

PADILHA, P.K. *et al.* **Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 10, e180290, 2018.

PASTORINO, B. *et al.* **Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (diptera, culicidae) in São paulo state, Brazil, 2009.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, v. 53, p.133–139, 2011.

PEREIRA, S.O. *et al.* **Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 111, p. 20–29, 2016.

PESSOA, V.E.M. *et al.* ***Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue.** *Entomotropica*, v. 28, n. 2, p. 75-86, 2013.

PEYREFITTE, C.N. **Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses.** *J. Virol. Methods*, v. 124, p. 65–71, 2005.

PUGEDO, H. *et al.* **HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p. 70-72, 2005

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil.** 2a ed. São Paulo, HUCITEC, Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1979.

ROUKENS, A.H.E; HALEM, K.; VISSER, A.W. **Long-Term Protection After Fractional-Dose Yellow Fever Vaccination: Follow-up Study of a Randomized, Controlled, Noninferiority Trial.** *Ann Intern Med.*, v. 169, n. 11, p. 761-765 , 2018

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE - SVS/MS. **Boletim Epidemiológico 51**, n. 49, p. 1–14, 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE -SVS/MS. **Informe N° 27 2017/2018.** 1–12. 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE - SVS/MS. **Informe – N° 43/2017.** Brasília. 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE - SVS/MS. **Manual de Vigilância Epidemiológica.** Brasília. 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE - SVS/MS. **Situação Epidemiológica Dengue**. 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>. Acesso em: 9 de out. 2017.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS – SES/MG. **Boletim epidemiológico - 20/06/2018**. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2018.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS – SES/MG. **Cobertura Vacinal em Minas Gerais**. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2018. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br/febreamarela>>. Acesso em: 10 de jan. 2018.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE BELO HORIZONTE – SMSA/BH; **A experiência de Belo Horizonte no enfrentamento às arboviroses: dengue, zika e chikungunya**. Belo Horizonte. 2016.

SERRA, O. P. *et al.* **Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

SOUZA, R. P. *et al.* **Isolation of Yellow Fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (DIPTERA, CULICIDAE) in São Paulo State, Brazil, 2009**. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 53, n. 3, p. 133-139, 2011.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. **Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue**. Informe Epidemiológico do SUS, v. 8, n. 4, p. 5-33, Brasília, 1999.

TERZIAN, A.C.B. *et al.* **Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil**. *Sci. Rep.*, v. 8, p. 1–15, 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017-2026**. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Yellow Fever Health Topic**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/en/>>. Acesso em: 01 de out. 2017.

ZUCHI, N. *et al.* **Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 109, p. 820–823, 2014.

## ANEXOS



Article

## Detection of Yellow Fever Virus in Sylvatic Mosquitoes during Disease Outbreaks of 2017–2018 in Minas Gerais State, Brazil

Guilherme Garcia Pinheiro <sup>1,3,\*</sup>, Marcelle Neves Rocha <sup>2</sup>, Maria Angélica de Oliveira <sup>1</sup>, Luciano Andrade Moreira <sup>2</sup> and José Dilermando Andrade Filho <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Coleção de Mosquitos Neotropicais, Instituto René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte 30190-002, Brazil; angelica.oliveira@fiocruz.br

<sup>2</sup> Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor, Instituto René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte 30190-002, Brazil; marcele.rocha@fiocruz.br (M.N.R.); luciano.andrade@fiocruz.br (L.A.M.)

<sup>3</sup> Grupo de Estudos em Leishmanioses, Instituto René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte 30190-002, Brazil

\* Correspondence: ggarcia@fiocruz.br (G.P.); jose.andrade@fiocruz.br (J.A.); Tel.: +55-31-3349-7856 (G.P.); +55-31-3349-7874 (J.A.)

Received: 25 February 2019; Accepted: 6 April 2019; Published: 10 May 2019



**Abstract:** Brazil has experienced several arbovirus outbreaks in recent years, among which yellow fever stands out. The state of Minas Gerais faced outbreaks of sylvatic yellow fever in 2017 and 2018, with 1002 confirmed cases and 340 deaths. This work presents the results of survey efforts to detect the yellow fever virus in mosquitoes from two conservation areas in the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. A total of 867 mosquitoes of 20 species were collected between September 2017 and May 2018, the most abundant being *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (von Humboldt, 1819) (31.3%), *Limatus durhamii* Theobald, 1901 (19.1%) and *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921 (18.2%). Total RNA was extracted from the mosquitoes for real-time PCR analysis for yellow fever, chikungunya, mayaro, Zika and dengue viruses. The yellow fever infection rate was 8.2% for *Hg. janthinomys* (13 mosquitoes), which is the main vector of sylvatic yellow fever in Brazil. In addition to surveying the mosquito fauna of these conservation units, this work demonstrates the importance of monitoring the circulation of viruses near large urban centers.

**Keywords:** arboviruses; yellow fever; mosquitoes

### 1. Introduction

Yellow fever (YF) is a severe acute disease with high lethality (20–50% among symptomatic cases) [1] and is caused by yellow fever virus (YFV), an arbovirus of the family *Flaviviridae*. The virus is exclusively transmitted to its hosts through bites of female mosquitoes of some species of the family *Culicidae* [2,3]. The disease presents two distinct transmission cycles: the sylvatic cycle and the urban cycle. Although these cycles share similarities regarding their etiology and disease evolution, they have different vectors and hosts. The main vector for the sylvatic cycle in the Americas is *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921, which is widely distributed in Brazil from the state of Santa Catarina in the south to the North Region of the country [4]. The main hosts of the virus are non-human primates (NHP's), such as howler monkeys (*Alouatta* sp), while humans become infected accidentally. The main vector of the urban cycle is *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1752), however there have been no reports of urban yellow fever in Brazil since 1942 [5,6]. On the African continent, however, the urban cycle is responsible for most of the human cases of YF recorded annually [2].

According to WHO [7], portions of 47 countries are considered endemic areas for YF, 34 of which are in Africa and 13 in Latin America, with 90% of the reported cases being concentrated in Africa. Between the end of 2016 and the middle of 2018, two of the largest outbreaks, in terms of cases, in the last 50 years were recorded in Brazil, with the Southeast Region being the most affected [6,8]. A total of 779 cases were confirmed with 262 deaths in 2016/2017, and 1376 confirmed cases with 483 deaths in 2017/2018 [8]. This increase in the number of cases may be related to factors such as low vaccination coverage and viral circulation in regions where it previously did not occur as well as changes in the viral genotype [9,10].

In addition to YF, Brazil has experienced outbreaks of other arboviruses during 2017–2018, including Zika, for which there were 3308 confirmed cases, chikungunya with 61,625 confirmed cases and dengue with 145,137 confirmed cases and 304 deaths [11]. Another arthropod-borne disease that has come to attention is mayaro virus disease, for which the majority of cases have been registered in the Northern Region of the country where it is endemic, although it has also been detected in other regions of Brazil [12].

The objective of this study was to survey the mosquito fauna of two conservation areas in the metropolitan region of Belo Horizonte, the capital of the state of Minas Gerais, Brazil, and to evaluate the viral presence of yellow fever virus (YFV), dengue virus (DENV), chikungunya virus (CHIKV), Zika virus (ZIKV) and mayaro virus (MAYV).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Area

The study was performed in Parque Estadual da Serra do Rola-Moça (PESRM; Serra do Rola-Moça State Park) and the Estação Ecológica de Fechos (EEF; Fechos Ecological Station), which are located in four municipalities (Belo Horizonte, Brumadinho, Ibirité and Nova Lima) in the metropolitan area of Belo Horizonte. The two reserves are located in an area of transition between the Brazilian Savannah (Cerrado) and Atlantic Forest biomes and possess areas with human occupation at their borders. The forest areas of the region are classified as seasonal semideciduous forest with trees of medium and high height. The climate is typically tropical with two distinct seasons; a rainy season between September and March, and a dry season during the rest of the year with little precipitation and low humidity [13].

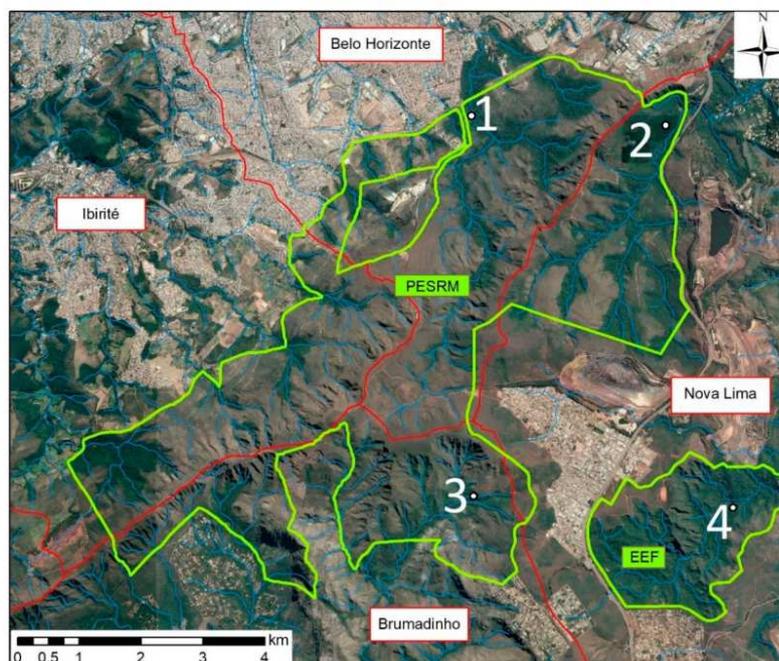
Three sampling areas were selected in PESRM and one in EEF (Figure 1). All four sampling areas were located in dense forest with little wind incidence, close to watercourses and 150 m to 1.5 km from inhabited areas. Area 1 (44°00'12" W, 20°00'12" S) was located 150 m from the district of Barreiro in the city of Belo Horizonte; Area 2 (43°58'12" W, 20°00'47" S) was located 1 km from a residential condominium in the municipality of Nova Lima; and Area 3 (44°00'02" W, 20°04'05" S) was located 1.5 km from a district of the municipality of Nova Lima and 3 km from a district of the municipality of Brumadinho. Area 4 (43°57'53" W, 20°04'21" S) was the only sampling area located in EEF and was selected because it is located near residential condominiums of the municipality of Nova Lima, however it differs from Area 2 as it has a larger area of forest. The location of each point was obtained through the use of Global Positioning System (GPS) (GPSMAP® 62s, GARMIN, Olathe, KS, USA).

### 2.2. Mosquito Collection and Identification

Mosquitoes were collected in September and December of 2017 and in February, March and May of 2018. Due to low yield and operational problems, the February collection was repeated in March. Daytime collections were carried out in the afternoon with a manual aspirator, an entomological net and automatic traps (HP model) [14] with CO<sub>2</sub> lures (dry ice). Night collections were carried out only with automatic traps baited with light and CO<sub>2</sub>, which were withdrawn the following morning. Two automatic traps were placed approximately 1.5 m off the ground with 20 m distance between them in all four points. All mosquitoes were collected at ground level. Climatic conditions were recorded for all

collections using thermohygrometer (Icoterm, Porto Alegre, Brazil). Collected mosquitoes were placed in individual tubes and stored in a styrofoam box with dry ice (to preserve viral RNA) before storage in a  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer.

The objective of the first field collection (September) was to perform a detailed survey of the mosquito fauna. Thus, all collected mosquitoes were mounted on entomological pins and identified to species or genus according to the classification proposed by Harbach & Kitching [15] and specific identification keys of the Coleção de Mosquitos Neotropicais (CMN; Neotropical Mosquito Collection) of the Instituto René Rachou (IRR; René Rachou Institute). These specimens served as a reference to accelerate the identification of mosquitoes collected in subsequent field trips in order to conserve any viral RNA present in mosquitoes. Species that were not sampled during the first field trip were thawed and mounted. All mounted mosquitoes were ultimately deposited in CMN. Brazilian government license: SISBIO n° 57712-1 and SISGEN n° A72F743.



**Figure 1.** Mosquito sampling areas (1 to 4) of Parque Estadual da Serra do Rola-Moça (PESRM) and Estação Ecológica de Fecho (EEF) and the nearby urban areas. Adapted from Instituto Estadual de Florestas [13]. The red lines represent the territorial limits between the municipalities, the green lines delimit the study area, the blue lines represent the water courses present in the region and the white dots represent the collection areas.

### 2.3. Virus Detection

Mosquitoes were individually macerated in screwcap tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing a glass bead (Sigma, Tokyo, Japan) and  $150\ \mu\text{L}$  of PBS for 1 min and 30 s using a minibeadbeater machine (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). RNA extraction was performed with  $50\ \mu\text{L}$  of macerated mosquito using  $50\ \mu\text{L}$  of squash buffer solution [Tris 99% (Inlab, São Paulo Brazil), sodium chloride (Synth, Diadema, Brazil), EDTA (Synth, Diadema, Brazil)] and added Proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany)  $0.6\ \mu\text{L}$  in Hard-Shell® 96-Well PCR Plates (low profile, thin

walled, skirted, and white/clear) (BioRad, Hercules, CA, USA). Extraction plates were heated on a thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 56 °C for 5 min, followed by 98 °C for 15 min, and then were stored at 12 °C until PCR. In this type of extraction, there is no need for sample purification; in the final solution, there is RNA and DNA from the extracted material [16].

Detection of viral RNA was performed via Real-time PCR (RT-qPCR) using the Gotaq® Probe 1-step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. Multiplex reactions were performed with the primers and probes described in Table 1.

Multiplex reactions targeted YFV, CHIKV and DENV in the first reaction, and ZIKV and MAYV in the second reaction, and were performed using a Lightcycler96 real-time PCR machine (Roche, Basel, Switzerland) with the following standard cycling conditions: reverse transcription at 45 °C for 15 min, reverse transcriptase inactivation and Gotaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) activation at 95 °C for 2 min and initial denaturation annealing and extension for 40 cycles at 95 °C for 15 s followed by 60 °C for 1 min. The reaction volume was 10 µL: 2× RT-PCR Reaction Mix (Promega, Madison, WI, USA), RT-enzyme solution (Promega, Madison, WI, USA), 1 µM YFV primer (For + Rev) (IDT, Coralville, IA, USA), 0.2 µM YFV probe (IDT, Coralville, IA, USA), 0.5 µM other primers (IDT, Coralville, IA, USA) and 0.1 µM other probes (IDT, Coralville, IA, USA). A fraction (1/40) of the total isolated RNA was used in the reactions.

RNA/DNA free water was used as the negative control, whereas for the positive control, a YFV gene fragment (5'-NC [17]) cloned into the pGemP plasmid (Promega, Madison, WI, USA) was used. The quantification of viral RNA from YFV infected mosquitoes were performed in comparison with serial dilution (from 10<sup>7</sup> to 1 copy of viral RNA) of a standard curve (Table S1) of the same gene used as the positive control. Therefore, it was possible to calculate the number of RNA copies per sample [18]. The limit of detection was on the order of 100 copies that corresponded to a Ct value of 36.

**Table 1.** Sequence of primers and probes used in the multiplex RT-qPCR reactions (F = forward primer, R = reverse primer and P = probe).

Virus	Sequence	Reference
Yellow fever virus (YFV)	F-5'/GCT AAT TGA GGT GYA TTG GTC TGC G/3'	[17]
	R-5'/CTG CTA ATC GCT CAA MGA ACG/3'	
	P-5'/FAM/ATC GAG TTG/ZEN/CTA GGC AAT AAA CAC/3IAbRQSp/3'	
Chikungunya virus (CHIKV)	F-5'/AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G/3'	[19]
	R-5'/CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT/3'	
	P-5'/5HEX/CCA ATG TCY/ZEN/TCM GCC TGG ACA CCT TT/3IABkFQ/3'	
Dengue virus (DENV)	F-5'/GGA AGC TGT ACC TTG GTG GTA AGG A/3'	[20] with modifications
	R-5'/CGT TCT GTG CCT GGA ATG ATG/3'	
	P-5'/TEX615/AAC AGC ATA TTG ACG CTG GGA GAG ACC AGA/3IAbRQSp/3'	
Zika virus (ZIKV)	F-5'/TTG GTC ATG ATA CTG CTG ATT GC/3'	[21]
	R-5'/CCT TCC ACA AAG TCC CTA TTG C/3'	
	P-5'/FAM/CGG CAT ACA/ZEN/GCA TCA GGT GCA TAG GAG/3IABkFQ/3'	
Mayaro virus (MAYV)	F-5'/GTG GTC GCA CAG TGA ATC TTT C/3'	[22]
	R-5'/CAA ATG TCC ACC AGG CGA AG/3'	
	P-5'/HEX/ATG GTG GTA/ZEN/GGC TAT CCG ACA GGT C/3IABkFQ/3'	

#### 2.4. Virus Isolation

All YFV positive samples (n = 13) were selected for viral isolation. The non-extracted part of the material that was stored at −80 °C was centrifuged for 2 min at 1500g at 12 °C. Then, 20 µL of the supernatant was inoculated into 25 cm<sup>2</sup> T-bottles (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) prepared with an *Aedes albopictus* C6/36 cell culture (2 × 10<sup>6</sup> cells per bottle) to isolate the virus. Adsorption was carried out for 1 hour at 28 °C and then 5 mL of L15 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Penicillin Streptomycin (Pen Strep) (Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 10 µg/mL was added [23]. The bottles were maintained for up to 10 days at 28 °C. As the negative control, the same protocol was performed with C6/36 cells only with L15 medium (Mock).

Samples were collected from the bottles individually after seven and 10 days of inoculation and RNA was extracted using the same methodology described above for the squash buffer solution. Next, RT-qPCR for YFV was performed, using the primers described in Table 1, in a singleplex reaction to confirm viral isolation for the 13 samples.

### 2.5. Data Analysis

All statistical analyses were performed using Prism (Graphpad Version 7.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The rate of infection per species in each collection area was calculated by dividing the number of positive mosquitoes by the total number of mosquitoes of the same species collected in the same area. Total infection rate per species was calculated by dividing the number of infected specimens of a species by the total number of specimens of that species.

## 3. Results

A total of 867 mosquitoes were collected, of which 89 were mounted to facilitate subsequent species identification and 778 were frozen and processed for viral RNA detection. As a result, 40 specimens were identified to the level of subgenus, six to the level of genus and the remainder to the level of species. A total of 20 mosquito species of 10 genera were captured (Table 2).

The most abundant species was *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (von Humboldt, 1819) (n = 271; 31.3%), followed by *Limatus durhamii* Theobald, 1901 (n = 166; 19.1%) and *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921 (n = 158, 18.2%).

**Table 2.** Mosquitoes collected between September 2017 and May 2018 in Parque Estadual da Serra do Rola-Moça (PERSM) and Estação Ecológica de Fechos (EEF), Minas Gerais, Brazil.

Taxonomic Category	Sep	Dec	Feb/Mar	May	Total
<i>Psorophora ferox</i>	0	25	243	3	271 (31.3%)
<i>Limatus durhamii</i>	7	36	118	5	166 (19.1%)
<i>Haemagogus janthinomys</i>	0	77	81	0	158 (18.2%)
<i>Aedes serratus</i>	0	53	43	1	97 (11.2%)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	0	24	18	0	42 (4.8%)
<i>Culex (Anoedioporpa) sp</i>	30	0	0	0	30 (3.5%)
<i>Sabethes purpureus</i>	6	4	12	2	24 (2.8%)
<i>Aedes albopictus</i>	0	8	8	0	16 (1.8%)
<i>Sabethes petrocchiaie</i>	0	2	7	5	14 (1.6%)
<i>Aedes terrens</i>	0	10	0	0	10 (1.2%)
<i>Aedcomyia squamipennis</i>	2	2	0	1	5 (0.6%)
<i>Culex sp</i>	0	4	1	0	5 (0.6%)
<i>Culex (Culex) sp</i>	0	1	1	2	4 (0.5%)
<i>Culex (Melanoconion) sp</i>	1	0	1	2	4 (0.5%)
<i>Sabethes albiprivus</i>	2	0	2	0	4 (0.5%)
<i>Aedes fluviatilis</i>	0	0	2	0	2 (0.2%)
<i>Culex (Microculex) sp</i>	0	0	2	0	2 (0.2%)
<i>Psorophora albigena</i>	0	2	0	0	2 (0.2%)
<i>Runchomyia cerqueirai</i>	2	0	0	0	2 (0.2%)
<i>Wyeomyia fuscipes</i>	2	0	0	0	2 (0.2%)
<i>Wyeomyia moerbista</i>	0	0	2	0	2 (0.2%)
<i>Anopheles eisenii</i>	1	0	0	0	1 (0.1%)
<i>Culex declarator</i>	0	0	1	0	1 (0.1%)
<i>Runchomyia reversa</i>	0	1	0	0	1 (0.1%)
<i>Wyeomyia alani</i>	0	0	1	0	1 (0.1%)
<i>Wyeomyia sp</i>	0	0	1	0	1 (0.1%)
<b>Total</b>	<b>53 (6.1%)</b>	<b>249 (28.7%)</b>	<b>544 (62.7%)</b>	<b>21 (2.4%)</b>	<b>867 (100%)</b>

Molecular analyses of the 778 mosquitoes revealed 13 YFV positives, all of which were *Haemagogus janthinomys* (Figure 2). Of the positives, 11 were collected on the same day (January 29, 2018) and in the same sampling area (Area 4). The other two positive mosquitoes were collected in December 2017 in two different areas (Areas 2 and 3). The infection rates for the sampled areas are shown in Table 3 and the Ct value of the samples are available in Table S2 in the supplementary material.

Absolute quantification of virus presence in mosquitoes was performed through a standard curve (Figure 3a). Positive mosquitoes possessed, on average,  $7.54 \times 10^7$  copies of YFV viral RNA. None of the collected mosquitoes were found to possess viral RNA of the other viruses tested (dengue, chikungunya, mayaro and Zika virus).

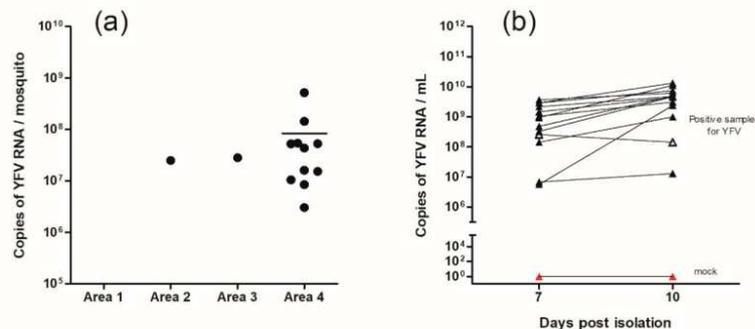
All YFV RNA-positive samples of the primary screening were isolated and confirmed via RT-qPCR. The number of viral RNA copies per milliliter obtained seven and 10 days after isolation are provided in Figure 3b. Quantification ranged from  $10^6$  to  $10^8$  copies of viral RNA/mL. Of the 13 isolated samples, 12 presented an increase in virus replication profile after 10 days compared to seven days. Only one sample did not present positive growth after seven days. Cells without supernatant inoculation (negative control—Mock) were indeed negative on RT-qPCR. The Ct value of the isolated samples are available in Table S3 in the supplementary material.



**Figure 2.** *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921, collected in Area 4 in December 2017.

**Table 3.** YFV infection rate for *Haemagogus janthinomys* by area.

Sampled Areas	Infected/Sampled	Infection Rate
Area 1	0/13	0%
Area 2	1/11	9.9%
Area 3	1/109	0.9%
Area 4	11/25	44%
Total	13/158	8.2%



**Figure 3.** (a) Quantification by RT-qPCR of YFV RNA copies per mosquito (*Hg. janthinomys*) by area. Area 1 (PESRM—Belo Horizonte city), Area 2 (PESRM—municipality of Nova Lima), Area 3 (PESRM—Brumadinho municipality) and Area 4 (EEF—Nova Lima municipality). The bar in area 4 represents the mean obtained from the 11 positive specimens ( $8.42 \times 10^7$ ). (b) Quantification of viral copies after seven and 10 days post viral isolation in C6/36 cells. From this, 13 positive samples from the primary screening were isolated. As the negative control, the mock (red triangle) was used. Twelve samples increased the viral amount (full black triangle). A single sample decreased the amount of viral RNA from seven to 10 days (empty black triangle).

#### 4. Discussion

The mosquito fauna collected in the two conservation areas was consistent with the study by Neves [24], who sampled Mangabeiras Municipal Park in Belo Horizonte, which has the same types of soil, climate and vegetation. These three areas are near one another and are connected by ecological corridors. From the 20 species captured in this study, only one (*Hg. janthinomys*) was found to be infected with YFV.

The absolute infection rate of *Hg. janthinomys* was 8.2%, which is similar to the 6.54% minimum infection rate (MIR) found by Dégallier [25] for the same species in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul. Dégallier's and the present study collected mosquitoes during, or shortly after, human YF cases were reported in the studied areas. Confirmation of the YFV infection through the virus isolation technique confirmed that the viruses detected in primary screening by RT-qPCR were infective particles.

Although three species of *Sabethes* spp. were collected ( $n = 42$  specimens), YFV infection was not detected in any of them. Among the collected species, only *Sabethes* (*Sabethes*) *albiprivus* Theobald, 1903 has been found to be naturally infected by YFV in South America [26]. It is likely that more species of *Sabethes* than those already incriminated play a secondary role in YFV maintenance [5,27].

*Haemagogus* (*Conopostegus*) *leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924) is considered the main vector of YFV in the South Region of Brazil [5], with most recent studies having detected YFV in this species [28,29] which is more easily found in peri-urban areas due to its greater capacity of adapting to modified environments [30]. Although 42 mosquitoes of this species were collected, viral RNA was not detected in any of them.

In a study carried out in 2008 in southern Brazil, a YFV infection rate of 1.88% was found for *Aedes* (*Ochlerotatus*) *serratus* (Theobald, 1901) [28]. Although 97 mosquitoes of this species were captured during the present study, none of them tested positive for YFV. Two factors could explain the detection of YFV in *Ae. serratus* infected in Cardoso [28]. The first one could be the presence of viral RNA in the still undigested bloodmeal, and the second would be genetic compatibility between the viral isolate and the *Ae. serratus* population present in that region which could be susceptible to the virus. Further studies are necessary to understand the role of *Ae. serratus* as a YF vector.

The lack of detection of either DENV or CHIKV in the collected mosquitoes, despite recurrent epidemics in the metropolitan area of Belo Horizonte [31], indicates that these two viruses do not seem to be circulating in the wild environments or in other possible vectors in the evaluated period (September 2017 to May 2018). This data suggests that the transmission of these viruses most likely occurs through the bite of *Ae. aegypti*, which is the main vector of these two diseases [32] and circulates mostly in urban areas [5]. The fact that no urban area was selected for this study may have contributed to the non-collection of *Ae. aegypti* specimens.

Although NHP carcasses were found naturally infected by ZIKV in Minas Gerais between 2016 and 2017 [33], no copies of ZIKV viral RNA were detected in any mosquito collected in the present study and, therefore, further studies are needed to identify if there is a Zika sylvatic cycle occurring. However, since it was not the main objective, no NHP survey in the PESRM in the EEF was performed in this study.

In Brazil, other arthropod-borne diseases with symptoms similar to YF and their transmission through the same vectors can generate confusion in the diagnosis of human cases. In this sense, Costa [12] detected the circulation of MAYV in 34 patients in 2015–2016 in the metropolitan region of Cuiabá in the state of Mato Grosso, while in 2013, Serra [34] found mosquitoes infected with MAYV in Cuiabá, suggesting the circulation of this virus outside the Northern Region of Brazil where it is endemic. *Haemagogus janthinomys* is considered the main vector of Mayaro virus disease [5] and despite the high number of *Hg. janthinomys* collected ( $n = 158$ ), MAYV was not detected in the present study. Further studies to monitor the circulation of this virus to reduce the risk of possible outbreaks in the Southeast Region, where it may already be circulating, are recommended.

The municipalities where infected mosquitoes were found in the present study—Nova Lima and Brumadinho—had, altogether, 50 YF confirmed cases with 14 deaths during the outbreak period (2017–2018). In addition, NHP epizootics were recorded in January 2018 in Brumadinho and in November 2017 and January 2018 in Nova Lima. Although the three areas where YFV were isolated (Areas 2, 3 and 4) are not as close to the urban perimeter as Area 1, six large residential condominiums are connected to them through ecological corridors, which can easily permit passage of mosquitoes and NHPs. Most of these residential condominiums are located within large areas of Atlantic Forest, which is ideal habitat for species of the genus *Haemagogus* [5].

*Haemagogus janthinomys* is a versatile mosquito. After feeding on a host infected with YFV and after the intrinsic period of infection, it is believed that the species can transmit the virus. Although there are no studies confirming viral transmission, it is considered to be the main vector since it is often found naturally infected at high rates [5,25]. In addition to being infective throughout its life, it has the ability to deposit infected eggs (transovarian transmission), which remain viable for months [5,35]. A mosquito that becomes infected in one of the areas can easily get close to human populations through ecological corridors, making these residential condominiums important areas of risk for YFV transmission and, therefore, they should receive special attention from health authorities.

In addition to the YF risks associated with building houses in forested areas, another activity that is considered to pose YF risks is ecotourism, which is very popular in the metropolitan area of Belo Horizonte due to the large number of preserved areas with trails and waterfalls that attract large numbers of tourists. Therefore, although *Ae. aegypti* have not been found to be infected with YFV during the 2016–2018 epidemic, the risk of re-urbanization of YF exists due to the large number of unvaccinated people who frequent forested areas. Vaccination campaigns in large urban centers is necessary to reduce the risk of outbreaks and the re-emergence of urban YF.

Yellow fever is a disease with high lethality, yet an effective vaccine is available. If a population has a vaccination coverage of 80%, it is expected to interrupt local YFV transmission [7]. In Brazil, the recommended areas for vaccination covered the north, mid-west and part of the southeast regions and in 2017, more than 4469 municipalities were included in the list. It has been observed that the displacement of the virus appears to be occurring rapidly, spreading to the states of São Paulo and Rio de Janeiro in 2016 and progressing in more areas in these states until 2018.

When new cases were reported in these states, the demand for vaccines increased in regions with high population density. With this, there was a need to increase the production of the vaccine in a short time. An alternative way to address this demand was the use of the fractionated vaccine. Recent studies have already indicated that the fractionated dose (587 IU) promoted similar immunity to the full dose (27,476 IU) [36]. However, this new strategy caused distrust in the population who did not believe that the fractionated dose was effective, thus impacting the coverage below the rates necessary to block local transmission at that moment of epidemics. Several yellow fever vaccination campaigns were promoted and an example of this was observed in January 2017. When the first cases were confirmed in Minas Gerais state, vaccination coverage was 57%, well below the 80% needed to stop local transmission. After intense vaccination campaigns, the coverage reached 90% in October 2018 [37] and no human cases of the disease were recorded from July 2018 to January 2019 [38]. The situation of vaccine coverage in other states was no different [39]. Currently, vaccination coverage reached 55% in the state of Bahia, 71% in Rio de Janeiro and 90% in São Paulo. This success in increasing vaccination coverage may be due to the extension of the campaign promoted by the government [39].

Although São Paulo has reached 90% coverage, YF cases are still being confirmed mainly in the region denominated Vale do Ribeira. In 2019, 86 cases were reported with 23 discarded, 32 confirmed and 31 under investigation. In this period, nine deaths (28.1% of lethality) have already been confirmed. Still in the state of São Paulo, epizootics were reported in 281 municipalities. This shows that despite the intense vaccination campaigns, the virus continues to spread to new regions [40].

One of the factors that could explain the increase in cases of YF is the exacerbated degradation of some natural environments. By losing their natural habitats, some species of NHPs have been forced to change and inhabit modified environments and suffer from overpopulation of small forest patches. In addition, the high density of non-immune NHPs in the Southeast coast, such as marmosets, in forests infested by *Haemagogus* favored the propagation of wild epizootic waves of the YFV to this region and, consequently, human infection. However, further research is needed to understand the dynamic of YFV spread through vast geographic extensions. It has been suggested that the YFV had an average dispersion of about 3 km per day in the Southeast since the beginning of 2017 [10,41]. In a previous outbreak in the South region, the trajectory of yellow fever virus circulation was estimated as 600 km in six months [42].

Associated with YFV dispersion, mosquitoes can disperse the virus over long distances, as demonstrated by Causey et al. [43] when they observed that of females of *Haemagogus* (*Haemagogus*) *pegazzinii* Brèthes, 1912 were collected 11.5 km away from a release point in a few days. These mosquitoes appear to have great dispersal capacity beyond the forests where they emerged from their original larval habitat, a pattern also observed in Central Brazil [44]. This great distance traveled by *Haemagogus* females could be due to a climate with low precipitation which would lead to a reduction in the arrangement of tree holes containing water. In this way, the search for oviposition sites could help in a greater displacement, as well as the search for blood feeding sources for egg maturation. Reduction of NHPs and other wild animal populations as a consequence of the degradation of natural habitat and deaths by YF would cause a reduction of blood sources, inducing the dispersal of the mosquito. Associated with dispersion, it is also interesting to note that wind convection currents around dusk could help these mosquitoes to disperse [39].

Immunization of NHPs could also be a preventive auxiliary form, as by prioritizing the vaccination of confined animals in parks and forest reserves contiguous to urban areas, as well as captive animals in research centers and zoos where the NHP's population is monitored, the immunization in these cases would be viable. Although this conduct could affect the sentinel role that NHPs play, it also helps limit the exposure of urban mosquitoes to the virus, as well as preserve biodiversity and protect endangered species in conservation areas [39].

## 5. Conclusions

For decades, scientists have warned public health authorities that once the virus started circulating near large metropolitan areas, the risk of re-emergence of YF would increase. Recent studies have revealed that cases of sylvatic YF and infected mosquitoes are being reported closer to large urban areas, such as Belo Horizonte and São Paulo. Although no cases of urban YF have been reported in Brazil since 1942, the re-emergence is still a health risk, especially considering that *Ae. aegypti*, the main vector of the urban form of the disease, is distributed throughout the country and the control measures of that vector in peri-urban and urban areas are inefficient.

Although there have been recent advances in understanding the eco-social determinants involved in the rapid spread of the YFV, several gaps in knowledge still exist. Systematic epidemiological surveillance programs of mosquitoes and NHPs are necessary and would be very effective for monitoring the circulation of the virus. In addition, continued vaccination campaigns would help to keep vaccination coverage at a high level. New NHP's immunization strategies are also crucial in parks, conservation areas and zoos, protecting endangered species and preserving biodiversity. The results of this study demonstrate the importance of monitoring the circulation of viruses near large urban centers and the search for an effective control and management of these arboviruses to minimize outbreaks such as those that occurred in the last two years.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2075-4450/10/5/136/s1>, Table S1: Standard curve values, Table S2: Viral quantification and Ct value of the YFV positive samples, Table S3: Viral quantification and Ct values obtained after viral isolation.

**Author Contributions:** Conceptualization, G.P. and M.O.; methodology, G.P., M.O. and M.R.; investigation, G.P. and M.R.; resources, J.A. and L.M.; writing—original draft preparation, G.P.; writing—review and editing, G.P., M.R., L.M. and J.A.; supervision, J.A.; funding acquisition, L.M. and J.D.

**Funding:** This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, FAPEMIG, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (302701/2016-8 and 310446/2017-1), Secretaria Municipal de Saúde and Instituto René Rachou—FIOCRUZ Minas.

**Acknowledgments:** We want to thank the World Mosquito Program for laboratory structure availability and Coleção de Mosquitos Neotropicais for the logistics with mosquito collections. L.M. is a CNPq fellow.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Monath, T.P. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res.* **2008**, *78*, 116–124. [[CrossRef](#)]
2. Monath, T.P.; Vasconcelos, P.F.C. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* **2015**, *64*, 160–173.
3. Goldani, L.Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *Brazilian J. Infect. Dis.* **2017**, *21*, 123–124. [[CrossRef](#)]
4. Forattini, O.P. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Cad. Saude Publica* **1995**. [[CrossRef](#)]
5. Consoli, R.; de Oliveira, R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*; Editora FIOCRUZ: Rio de Janeiro, Brazil, 1994; pp. 39–152.
6. Franco, O. *História da febre amarela no Brasil*; Ministério da Saúde: Rio de Janeiro, Brazil, 1969; pp. 8–95.
7. World Health Organization. A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017–2026. WHO: Geneva, Switzerland, 2017; ISBN 9789241513661.
8. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil—2017/2018. Available online: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf> (accessed on 29 March 2019).
9. Litvoc, M.N.; Novaes, C.T.G.; Lopes, M.I.B.F. Yellow fever. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2018**, *64*, 106–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gómez, M.M.; de Abreu, F.V.S.; Dos Santos, A.A.C.; de Mello, I.S.; Santos, M.P.; Ribeiro, I.P.; Ferreira-de-Brito, A.; de Miranda, R.M.; de Castro, M.G.; Ribeiro, M.S.; et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 536–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 44 de 2018. Available online: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/23/Publicacao-2018-57-SE44.pdf> (accessed on 29 March 2019).

12. Zuchi, N.; da Silva Heinen, L.B.; dos Santos, M.A.M.; Pereira, F.C.; Shlessarenko, R.D. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2014**, *109*, 820–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Instituto Estadual de Floristas. *Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Rola-moça, incluindo Estação Ecológica de Fechos*; IEF: Belo Horizonte, Brazil, 2007; pp. 11–35.
14. Pugedo, H.; Barata, R.A.; França-Silva, J.C.; Silva, J.C.; Dias, E.S. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos TT—HP: An improved model of suction light trap for the capture of small insects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2005**, *38*, 70–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Harbach, R.E.; Kitching, I.J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Syst. Entomol.* **1998**, *23*. [[CrossRef](#)]
16. Dutra, H.L.C.; Rodrigues, S.L.; Mansur, S.B.; de Oliveira, S.P.; Caragata, E.P.; Moreira, L.A. Development and physiological effects of an artificial diet for Wolbachia-infected *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Domingo, C.; Patel, P.; Yillah, J.; Weidmann, M.; Méndez, J.A.; Nakouné, E.R.; Niedrig, M. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 4054–4060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rocha, M.N.; Duarte, M.M.; Mansur, S.B.; Daoud, B.; Pereira, T.N.; Émile, T.; Adelino, R.; Giovanetti, M.; Carlos, L.; Alcantara, J.; et al. Pluripotency of *Wolbachia* against Arbovirus: The case of yellow fever. [version 1; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]. *Gates Open Res.* **2019**, 1–17.
19. Pastorino, B.; Bessaud, M.; Grandadam, M.; Murri, S.; Tolou, H.J.; Peyrefitte, C.N. Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J. Virol. Methods* **2005**, *124*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Pacidônio, E.C.; Caragata, E.P.; Alves, D.M.; Marques, J.T.; Moreira, L.A. The impact of Wolbachia infection on the rate of vertical transmission of dengue virus in Brazilian *Aedes aegypti*. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Lanciotti, R.S.; Kosoy, O.L.; Laven, J.J.; Velez, J.O.; Lambert, A.J.; Johnson, A.J.; Stanfield, S.M.; Duffy, M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1232–1239. [[CrossRef](#)]
22. Long, K.C.; Ziegler, S.A.; Thangamani, S.; Hausser, N.L.; Kochel, T.J.; Higgs, S.; Tesh, R.B. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 750–757. [[CrossRef](#)]
23. Figueiredo, L.B.; Cecílio, A.B.; Ferreira, G.P.; Drumond, B.P.; de Oliveira, J.G.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 314–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Neves, D.P.; da Silva, J.E. Aspectos da biologia dos culicídeos do Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte. I. Espécies locais e variação estacional. *Arq. da Esc. Veterinária da UFMG* **1973**, *25*.
25. Dégallier, N.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Vasconcelos, P.F.C.; Travassos da Rosa, E.S.; Rodrigues, S.G.; Sa, F.G.C.; Travassos da Rosa, J.F.S. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. *Arthropod-Borne Virus Inf. Exch.* **1993**, 21–22.
26. Goenaga, S.; Fabbri, C.; Dueñas, J.C.R.; Gardenal, C.N.; Rossi, G.C.; Calderon, G.; Morales, M.A.; Garcia, J.B.; Enria, D.A.; Levis, S. Isolation of Yellow Fever Virus from Mosquitoes in Misiones Province, Argentina. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 986–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hervé, J.-P.; Dégallier, N.; Rosa, A.P.A.T.; da Filho, G.C.S. A febre amarela silvestre no Brasil e os riscos de propagação urbana. *Hiléia Médica* **1985**, *7*, 31–40.
28. Cardoso, J.d.C.; de Almeida, M.A.B.; dos Santos, E.; da Fonseca, D.F.; Sallum, M.A.M.; Noll, C.A.; Monteiro, H.A.d.O.; Cruz, A.C.R.; Carvalho, V.L.; Pinto, E.V.; et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1918–1924.
29. de Souza, R.P.; Petrella, S.; Coimbra, T.L.M.; Maeda, A.Y.; Rocco, I.M.; Bisordi, I.; Silveira, V.R.; Pereira, L.E.; Suzuki, A.; dos Santos Silva, S.J.; et al. Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Diptera, Culicidae) in São Paulo state, Brazil, 2009. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2011**, *53*, 133–139. [[CrossRef](#)]
30. Marcondes, C.B.; Alencar, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev. Biomed.* **2010**, *21*, 221–238.

31. Prefeitura de Belo Horizonte—PBH A experiência de Belo Horizonte no enfrentamento às arboviroses: Dengue, zika e chikungunya. *Secr. Munic. Saúde* **2016**, *28*.
32. Moreira, L.A.; Iturbe-Ormaetxe, I.; Jeffery, J.A.; Lu, G.; Pyke, A.T.; Hedges, L.M.; Rocha, B.C.; Hall-Mendelin, S.; Day, A.; Riegler, M.; et al. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* **2009**, *139*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Terzian, A.C.B.; Zini, N.; Sacchetto, L.; Rocha, R.F.; Parra, M.C.P.; Del Sarto, J.L.; Dias, A.C.F.; Coutinho, E.; Rayra, J.; da Silva, R.A.; et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)]
34. Pereira Serra, O.; Fernandes Cardoso, B.; Maria Ribeiro, A.L.; dos Santos, F.A.L.; Dezengrini Silhessarenko, R. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 20–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mondet, B.; Vasconcelos, P.F.C.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Travassos da Rosa, E.S.; Rodrigues, S.G.; Travassos da Rosa, J.F.S.; Bicout, D.J. Isolation of Yellow Fever Virus from Nulliparous *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* in Eastern Amazonia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2002**, *2*, 47–50. [[CrossRef](#)]
36. Martins, R.M.; Maia, M.D.L.S.; Farias, R.H.G.; Camacho, L.A.B.; Freire, M.S.; Galler, R.; Yamamura, A.M.Y.; Almeida, L.F.C.; Lima, S.M.B.; Nogueira, R.M.R.; et al. 17DD yellow fever vaccine: A double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 879–888. [[CrossRef](#)]
37. Secretaria Estadual de Saúde/MG. Cobertura Vacinal em Minas Gerais. Available online: <http://www.saude.mg.gov.br/febreamarela> (accessed on 9 April 2019).
38. Secretaria Estadual de Saúde/MG. Boletim epidemiológico—21/06/2018. Available online: <http://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/story/10625-informe-epidemiologico-da-febre-amarela-21-06> (accessed on 9 April 2019).
39. Possas, C.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Tauil, P.L.; Pinheiro, F.d.P.; Pissinatti, A.; Cunha, R.V.d.C.; Freire, M.; Martins, R.M.; Homma, A. Yellow fever outbreak in Brazil: The puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, e180278. [[CrossRef](#)]
40. Secretaria Estadual de Saúde/SP. Boletim Epidemiológico Febre Amarela—04/02/2019. Available online: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/2019/fa19\\_boletim\\_epid\\_0402.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/2019/fa19_boletim_epid_0402.pdf) (accessed on 9 April 2019).
41. Bicca-marques, J.C.; Freitas, D.S. De Conservation letter The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: Protecting howler monkeys is a matter of public health. *Access* **2010**, *3*, 78–89.
42. Almeida, M.A.B.; da Cardoso, J.C.; dos Santos, E.; da Fonseca, D.F.; Cruz, L.L.; Faraco, F.J.C.; Bercini, M.A.; Vettorello, K.C.; Porto, M.A.; Mohrdieck, R.; et al. Surveillance for Yellow Fever Virus in Non-Human Primates in Southern Brazil, 2001–2011: A Tool for Prioritizing Human Populations for Vaccination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Causey, O.R.; Kumm, H.W.; Laemmert, H.W. Dispersion of forest mosquitoes in Brazil; further studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1950**, *s1-30*. [[CrossRef](#)]
44. Pinheiro, F.P.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Moraes, M.A.P. An epidemic of yellow fever in central Brazil, 1972–1973. II. Ecological studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *30*. [[CrossRef](#)]





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 57712-1	<b>Data da Emissão:</b> 29/03/2017 14:05	<b>Data para Revalidação*:</b> 28/04/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: [REDACTED]	CPF: [REDACTED]
Título do Projeto: Levantamento de Culicídeos (Diptera: Culicidae) e detecção da infecção por Arbovírus no Parque Estadual da Serra do Rola Moça ? Belo Horizonte, Minas Gerais	
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta	03/2017	12/2021

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Guilherme Garcia Pinheiro	Aluno de Mestrado	118.161.036-24	MG 15648502 SSP-MG	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BELO HORIZONTE	MG	Parque Estadual da Serra do Rola Moça	Fora de UC Federal
2	BRUMADINHO	MG	Parque Estadual da Serra do Rola Moça	Fora de UC Federal
3	NOVA LIMA	MG	Parque Estadual da Serra do Rola Moça	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 74594541**



Página 1/4



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL  
INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS  
DIRETORIA DE PROTEÇÃO À FAUNA  
GERÊNCIA DE PROJETOS E PESQUISAS

## AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Número da Autorização	Data da Emissão	Prazo de Validade
046/2017	29/08/2017	28/04/2018

### INFORMAÇÕES DO RESPONSÁVEL E DO PROJETO

Título do Projeto	"Levantamento de Culicídeos (Diptera: Culicidae) e detecção da infecção por Arbovirus no Parque Estadual Serra do Rola-Moça - Belo Horizonte, Minas Gerais"		
Instituição	Centro de Pesquisa René Rachou - Fiocruz Minas		
Responsável	Guilherme Garcia Pinheiro	CPF	[REDACTED]
Logradouro	[REDACTED]		
Nº/KM	[REDACTED]	Complemento	[REDACTED]
Bairro/Localidade	[REDACTED]	UF	MG
Município	Belo Horizonte	CEP	[REDACTED]
Telefone	[REDACTED]	Celular	[REDACTED]
E-mail	[REDACTED]		

### INTEGRANTES DA EQUIPE

Nome	Instituição	CPF/RG	Função
Ana Carolina de Souza Lima	CPqRR/Fiocruz	[REDACTED]	Técnico
Luiza Prado Rosa de Matos	CPqRR/Fiocruz	[REDACTED]	Técnico
Magno Antônio dos Santo	CPqRR/Fiocruz	[REDACTED]	Motorista
Maria Angélica de Oliveira	CPqRR/Fiocruz	[REDACTED]	Coordenadora

### INFORMAÇÕES DAS ATIVIDADES

Tipo de Atividade:	<input checked="" type="checkbox"/> Captura	<input checked="" type="checkbox"/> Coleta	<input checked="" type="checkbox"/> Transporte	<input type="checkbox"/> Sem Coleta/Captura
	<input type="checkbox"/> Abiótica	<input type="checkbox"/> Microrganismos	<input type="checkbox"/> Fungo	<input type="checkbox"/> Botânica
	<input type="checkbox"/> Anfíbios	<input type="checkbox"/> Répteis	<input type="checkbox"/> Aves	<input checked="" type="checkbox"/> Invertebrados
			<input type="checkbox"/> Mamíferos	<input type="checkbox"/> Ictiofauna

**OBSERVAÇÕES** A autorização permitirá a captura, coleta e transporte de invertebrados (Culicídeos) conforme tabela de estimativa de coleta e autorização do SISBIO N° 57712-1

### LOCAL DA ATIVIDADE - EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL

Unidade de Conservação	Responsável pela UC	Contato (Telefone e e-mail)	Endereço da UC	Assinatura do Responsável pela UC
Parque Estadual da Serra do Rola-Moça	Marcus Vinícius de Freitas	perolamoca@meioambiente.mg.gov.br marcus.freitas@meioambiente.mg.gov.br (31) 3581-3523	Em Nova Lima: Av. Montreal s/ n°, B. Jardim Canadá CEP: 34.000-000	
Estação Ecológicas de Fechos	Coordenadores do regional Centro Sul: Ana Paula Cerqueira de Barros Pinheiro e Carlos Jose Andrade Silveira	ana.pinheiro@meioambiente.mg.gov.br carlos.silveira@meioambiente.mg.gov.br (32) 3052-1707 (31) 98530-4449	Nova Lima: Av. Montreal s/ n°, B. Jardim Canadá CEP: 34.000-000	 Marcus Vinícius de Freitas Gerente MASP 1020885-8 CRBio 07152/4D P. E. S. Rola Moça

Esta autorização será válida apenas com a autenticação do responsável pela(s) Unidade(s) de Conservação.

### LOCAL DA ATIVIDADE - FORA DE UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL (apenas para material botânico)

Município(s)	Não se aplica
--------------	---------------

Assinatura do responsável pela Autorização

Janaina A. B. Aguiar  
Gerente de Projetos e Pesquisas do IEF  
Matr: 1131666-0

Número do Processo SIGED/SIPRO/GPROP





Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A72F743**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A72F743**  
 Usuário: **Fiocruz**  
 CPF/CNPJ: **33.781.055/0001-35**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Yellow Fever virus**

Título da Atividade: **Detecção de arbovírus em mosquitos silvestres**

**Equipe**

<b>José Dilermando Andrade Filho</b>	<b>Fiocruz</b>
<b>Guilherme Garcia Pinheiro</b>	<b>Fiocruz</b>

Data do Cadastro: **14/11/2018 16:09:47**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:10** de **14/11/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**



**Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso  
Cadastro nº AC07198**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AC07198**  
Usuário: **Fiocruz**  
CPF/CNPJ: **33.781.055/0001-35**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Aedes terrens**  
**Culex sp**  
**Haemagogus janthinomys**  
**Haemagogus leucocelaenus**  
**Limatus durhamii**  
**Psorophora ferox**  
**Runchomyia cerqueirai**  
**Sabethes albiprivus**  
**Sabethes purpureus**  
**Aedeomyia squamipennis**  
**Aedes albopictus**  
**Aedes fluviatilis**  
**Aedes serratus**

**Anopheles eiseni**  
**Culex declarator**  
**Psorophora albigena**  
**Runchomyia reversa**  
**Sabethes petrocchiae**  
**Wyeomyia alani**  
**Wyeomyia fuscipes**  
**Wyeomyia moerbista**  
**Wyeomyia sp**

Título da Atividade: **Detecção de arbovírus em mosquitos silvestres**

**Equipe**

<b>José Dilermando Andrade Filho</b>	<b>Fiocruz</b>
<b>Guilherme Garcia Pinheiro</b>	<b>Fiocruz</b>

Data do Cadastro: **14/11/2018 15:58:00**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:10** de **14/11/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**