

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

LARISSA KROKOVSKY

VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DE ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA  
EM MOSQUITOS DOS GÊNEROS *Aedes* E *Culex*

RECIFE

2019

LARISSA KROKOVSKY

**VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DE ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA  
EM MOSQUITOS DOS GÊNEROS *Aedes* E *Culex***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em ciências.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientadores: Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva

Dra. Duschinka Ribeiro Duarte Guedes

**RECIFE**

**2019**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

K93v Krokovsky, Larissa.  
Vigilância entomológica de arbovírus de importância médica em mosquitos dos gêneros aedes e culex / Larissa Krokovsky. - Recife: [s.n.], 2019.  
113 p. : ilus., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres;  
coorientadores: Marcelo Henrique Santos Paiva, Duschinka Ribeiro Duarte Guedes.

1. Arbovirus. 2. Vigilância. 3. Aedes. 4. Culex. Controle de vetores. 5. Monitoramento epidemiológico. 6. Insetos vetores. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Paiva, Marcelo Henrique Santos. III. Guedes, Duschinka Ribeiro Duarte. IV. Título.

LARISSA KROKOVSKY

**VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DE ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA  
EM MOSQUITOS DOS GÊNEROS *Aedes* E *Culex***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em ciências.

Aprovado em 13 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira  
Instituto Aggeu Magalhães

---

Dra. Ana Lisa do Vale Gomes  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres  
Instituto Aggeu Magalhães

Dedico este trabalho a minha querida avó,  
Analice.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo e por todos.

Aos meus orientadores, Dra. Constância Ayres (Tans), Dr. Marcelo Paiva (Boss/Daddy) e Dra. Duschinka Guedes (Dukinha/Mummy), pelos ensinamentos, paciência e broncas.

Aos queridos Dr. Gabriel Wallau, Dra. Rosângela Barbosa, Dra. Mariana Sobral e amiga Laís pela colaboração e apoio desenvolvidos neste trabalho.

A todos que fazem parte do Departamento de Entomologia, principalmente as minhas “pupas”, que fizeram todos os dias no laboratório mais felizes e cheios de amizade. Sou grata por compartilhar tantas horas do meu dia com pessoas maravilhosas.

As minhas “Biomédicas” Thaysa, Adriana, Jade e Natalia que me ajudaram nos momentos difíceis e celebraram as conquistas durante minha jornada científica.

Aos meus amigos Priscilla, Raquel, Carime, Mirella, Istefani, Vinícius, Rebbeka, Deborah, Gabriella e Brivaldo Neto que sempre mostraram apoio, paciência e amor. É uma dádiva ter vocês como amigos.

Aos meus quase familiares Guilherme, Beatriz, Francisco, Cláudia e Edvaldo que nos momentos difíceis sabiam exatamente o que me dizer.

A minha família querida, que é o maior bem que tenho na vida. Vocês são a família mais unida, amorosa e forte que conheço. Tenho orgulho de ser uma Krokovsky.

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição para o crescimento do trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

A Secretaria de Saúde Estadual pela parceria e coleta de mosquitos.

A FACEPE, CNPq e IAM pela bolsa, incentivo e infraestrutura.

*Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.*

*-Friedrich Nietzsche*

KROKOVSKY, L. **Vigilância Entomológica de arbovírus de importância médica em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex***. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

## RESUMO

Mosquitos do gênero *Aedes* são os principais vetores dos vírus Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV). Além destes mosquitos, estudos demonstraram em condições de laboratório, a competência vetorial de *Culex quinquefasciatus* em transmitir ZIKV. A vigilância entomológica é uma ferramenta importante para o monitoramento de vetores, através de vários indicadores de presença de mosquitos, e pode também ser realizada a partir da detecção do agente patogênico em seu vetor. Diante do exposto, este trabalho avaliou a circulação de DENV, ZIKV e CHIKV em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* coletados na Região Metropolitana de Recife (RMR). Para isto, os mosquitos foram coletados no período de 2015 a 2017 por meio de aspiradores, separados em grupos (*pools*) por espécie, sexo e estado alimentar. Os *pools* de fêmeas foram submetidos à extração de RNA, RT-PCR e RT-qPCR. Adicionalmente, foi feito isolamento viral a partir das amostras positivas em culturas de células C6/36, seguido de sequenciamento de nova geração dessas amostras. No total, foram coletadas 6.227 fêmeas, das quais 51,75% foram da espécie *A. aegypti* (497 *pools*), 0,03% de *A. albopictus* (1 *pool*), 0,01% de *A. taeniorhynchus* (1 *pool*), 0,17% de *A. scapularis* (1 *pool*) e 48,04% de *C. quinquefasciatus* (549 *pools*). No total foram detectados 19 *pools* positivos para DENV (sorotipos 2 e 4), 194 para ZIKV e seis para CHIKV. Em relação à MIR para ZIKV, a taxa encontrada variou de 18,59 a 1.000, para DENV variou de 1,70 a 15,75 e para CHIKV a MIR encontrada foi de 2,75. Três amostras para DENV e uma para ZIKV apresentaram efeito citopático após inoculação em células C6/36. Um total de oito genomas de ZIKV foram sequenciados, com cobertura que variou de 24% a 100%. A investigação realizada permitiu acompanhar a dinâmica de infecção vetorial e demonstrou que mesmo após a epidemia, ainda foi possível detectar mosquitos positivos na RMR.

**Palavras-chave:** Vigilância, Arbovírus, *Aedes*, *Culex*.

KROKOVSKY, L. **Entomological surveillance of medical importance arboviruses in mosquitoes of the genus *Aedes* and *Culex***. 2019. Dissertation (Master's degree in Life Sciences and Biotechnology for Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

### ABSTRACT

Mosquitoes from *Aedes* genus are the main vectors of Dengue (DENV), Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses. In addition, studies have demonstrated in laboratory conditions, the vector competence of *Culex quinquefasciatus* in transmitting ZIKV. Entomological surveillance is an important tool for vector monitoring, with use rates that indicate the presence of mosquitoes, and can also be performed through the detection of the pathogen in the vector. Given the above, this study analyzed the circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in mosquitoes of the genera *Aedes* and *Culex* collected in the Metropolitan Region of Recife (MRR). For this, mosquitoes were collected from 2015 to 2017 by aspirators, separated into pools by species, sex and feed status. Pools were submitted to RNA extraction, RT-PCR and RT-qPCR. In addition, viral isolation was performed from positive samples in C6 / 36 cell cultures, followed by the next generation sequencing. In a total of 6,227 females were collected, of which 51.75% were *A. aegypti* (497 pools), 0.03% *A. albopictus* (1 pool), 0.01% *A. taeniorhynchus* (1 pool), 0.17% *A. scapularis* (1 pool) and 48.04% *C. quinquefasciatus* (549 pools). From these samples, 19 pools were positive for DENV (serotypes 2 and 4), 194 for ZIKV and six for CHIKV. Regarding MIR for ZIKV, the rate found ranged from 18.59 to 1,000, for DENV ranged from 1.70 to 15.75 and for CHIKV the MIR found was 2.75. Three samples of DENV and one ZIKV showed cytopathic effect after inoculation into C6 / 36 cells. A total of eight ZIKV genomes were sequenced, with coverage ranging from 24% to 100%. The investigation made it possible to monitor the vector infection and demonstrate that after the epidemic was also possible to detect positive mosquitoes in the MRR.

**Key words:** Surveillance, Arbovirus, *Aedes*, *Culex*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Esquema apresentando o ciclo de desenvolvimento de mosquitos do gênero <i>Aedes</i> .	19
<b>Figura 2-</b>	Fêmeas de mosquitos do gênero <i>Aedes</i>	20
<b>Figura 3-</b>	Desenho esquemático descrevendo os parâmetros utilizados para calcular a capacidade vetorial	21
<b>Figura 4-</b>	Ciclo de desenvolvimento de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	24
<b>Figura 5-</b>	Fêmea de <i>Culex quinquefasciatus</i> no momento do repasto sanguíneo.	25
<b>Figura 6-</b>	Organização do genoma de <i>Flavivirus</i> .	26
<b>Figura 7-</b>	Desenho esquemático do ciclo do vírus Dengue dentro do <i>Aedes aegypti</i> .	27
<b>Figura 8-</b>	Mapa de transmissão e cocirculação mundial de arbovírus.	28
<b>Figura 9-</b>	Cortes celulares de glândula salivar de <i>Culex quinquefasciatus</i> infectado com o vírus Zika no 7º dia pós infecção.	30
<b>Figura 10-</b>	Organização do genoma de <i>Alphavirus</i> .	31
<b>Figura 11-</b>	Fotos de Preparações imunocitoquímicas de tecidos de <i>Aedes albopictus</i> infectados com o vírus Chikungunya.	32
<b>Figura 12-</b>	Árvore de decisão para triagem de patógenos (vírus / parasita) em espécies de mosquitos invasoras com procedimentos, conjuntos de dados e resultados esperados.	38
<b>Figura 13-</b>	Mapa da Região Metropolitana de Recife com a distribuição espacial dos pontos coletados.	43
<b>Figura 14-</b>	Coleta de mosquito utilizando aspiradores e saco de contenção de amostra com mosquitos vivos.	45
<b>Figura 15-</b>	Gel de agarose 1,5% representativo do padrão de bandas de vírus Dengue na RT-PCR.	57
<b>Figura 16-</b>	Gráfico da curva de amplificação de Zika e Chikungunya na RT-PCR em tempo real.	58
<b>Figura 17-</b>	Painel de fotos da 3ª passagem de células C6/36 com DENV isolados de mosquitos no quarto dia pós-infecção	60

<b>Figura 18-</b>	Painel de fotos do ensaio de imunofluorescência para ZIKV isolado de <i>Aedes aegypti</i> em células C6/36 (2 <sup>a</sup> passagem) no sexto dia pós-infecção.	60
<b>Figura 19-</b>	A amplitude de cobertura genômica das sequências de Zika.	63
<b>Figura 20-</b>	Visão ampla da relação filogenética entre os genomas de Zika.	64
<b>Figura 21-</b>	Visão detalhada da construção filogenética de máxima verossimilhança dos genomas de Zika.	65
<b>Figura 22-</b>	Mapa de densidade de mosquitos infectados com Dengue.	66
<b>Figura 23-</b>	Mapa de densidade de mosquitos infectados com Zika.	67
<b>Figura 24-</b>	Mapa de densidade de mosquitos infectados com Chikungunya.	67

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b>	Descrição dos reagentes utilizados na reação de RT-PCR <i>Duplex</i> gênero específica.	47
<b>Quadro 2-</b>	<i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR e RT-qPCR.	48
<b>Quadro 3-</b>	Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR <i>Duplex</i> gênero específica.	49
<b>Quadro 4-</b>	Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR <i>Multiplex</i> espécie específica para <i>Flavivirus</i> .	50
<b>Quadro 5-</b>	Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR <i>Multiplex</i> espécie específica para <i>Alphavirus</i> .	50
<b>Quadro 6-</b>	Descrição dos reagentes utilizados na reação de RT-PCR para Dengue.	51
<b>Quadro 7-</b>	Descrição dos reagentes utilizados na reação de RT-qPCR para Zika e Chikungunya.	52
<b>Quadro 8-</b>	Descrição dos anticorpos utilizados no ensaio de Imunofluorescência.	54
<b>Quadro 9-</b>	Descrição das amostras positivas e valores de MIR para cada espécie.	59
<b>Quadro 10-</b>	Descrição das sequências do vírus Zika obtidas após Sequenciamento de Nova Geração a partir de amostras de mosquitos.	62
<b>Quadro 11-</b>	Indicadores sociais de bairros do município de Recife com circulação simultânea de vírus Dengue, Zika e Chikungunya identificados em populações de mosquitos no período de 2015 a 2017.	68

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrômetros
<b>C</b>	Capsídeo
<b>cDNA</b>	<i>Complementar Deoxyribonucleic acid</i>
<b>CAAE</b>	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CHIKV</b>	<i>Chikungunya virus</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>DENV</b>	<i>Dengue virus</i>
<b>DENV1</b>	<i>Dengue virus type 1</i>
<b>DENV2</b>	<i>Dengue virus type 2</i>
<b>DENV3</b>	<i>Dengue virus type 3</i>
<b>DENV4</b>	<i>Dengue virus type 4</i>
<b>dNTP</b>	<i>Desoxirribonucleotídeos fosfatados</i>
<b>dpi</b>	Dias pós-infecção
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EC</b>	Efeito Citopático
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EEEV</b>	<i>Eastern Equine Encephalitis virus</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FC</b>	Teste de fixação de complemento
<b>hab</b>	Habitantes

<b>IAM</b>	Instituto Aggeu Magalhães
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>kb</b>	Kilobases
<b>L1</b>	Larva de primeiro estágio
<b>L-15</b>	Leibovitz
<b>L2</b>	Larva de segundo estágio
<b>L3</b>	Larva de terceiro estágio
<b>L4</b>	Larva de quarto estágio
<b>M</b>	Molar
<b>MAYV</b>	<i>Mayaro virus</i>
<b>MIR</b>	<i>Minimum infection rate</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OROV</b>	<i>Oropouche virus</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PE</b>	Pernambuco
<b>RMR</b>	Região Metropolitana do Recife
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>ROV</b>	<i>Rocio virus</i>
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse transcription Polymerase Chain Reaction</i>

<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RVFV</b>	<i>Rift Valley Fever virus</i>
<b>SE</b>	Semana Epidemiológica
<b>SES</b>	Secretaria Estadual de Saúde
<b>SLEV</b>	<i>Saint Louis Encephalitis virus</i>
<b>SLM</b>	São Lourenço da Mata
<b>UPA</b>	Unidade de Pronto Atendimento
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WNV</b>	<i>West Nile virus</i>
<b>YFV</b>	<i>Yellow Fever virus</i>
<b>ZIKV</b>	<i>Zika virus</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1 Mosquitos do gênero <i>Aedes</i></b> .....	19
2.1.1 <i>Aedes aegypti</i> , Linnaeus, 1762 .....	20
2.1.2 <i>Aedes albopictus</i> , Skuse, 1895.....	22
2.1.3 <i>Aedes taeniorhynchus</i> , Wiedemann, 1821.....	22
2.1.4 <i>Aedes scapularis</i> , Rondanni, 1848.....	23
<b>2.2 <i>Culex quinquefasciatus</i>, Say, 1823</b> .....	23
<b>2.3. Os arbovírus</b> .....	25
2.3.1 <i>Flavivirus</i> .....	25
2.3.1.1 Vírus Dengue.....	26
2.3.1.2 Vírus Zika.....	29
2.3.2 <i>Alphavirus</i> .....	31
2.3.2.1 Vírus Chikungunya.....	31
<b>2.4 Vigilância Epidemiológica</b> .....	33
2.4.1 <i>Vigilância Laboratorial</i> .....	34
2.4.2 <i>Vigilância Entomológica</i> .....	35
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	40
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	41
<b>6 OBJETIVO GERAL</b> .....	42
<b>6.1 Objetivos específicos</b> .....	42
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
<b>7.1 Área de estudo</b> .....	43
<b>7.2 Coletas e separação de mosquitos</b> .....	44

<b>7.3 Preparação do macerado de mosquitos (homogenato)</b> .....	45
<b>7.4 Cepas virais utilizadas</b> .....	45
<b>7.5 Extração de RNA</b> .....	46
<b>7.6 Tratamento com DNase</b> .....	46
<b>7.7 Detecção da presença de vírus</b> .....	47
<b>7.8 Extração de DNA e Detecção de DNA Mitocondrial</b> .....	52
<b>7.9 Cálculo da Taxa de Infecção Mínima (MIR)</b> .....	53
<b>7.10 Isolamento Viral</b> .....	53
<b>7.11 Imunofluorescência Indireta</b> .....	54
<b>7.12 Sequenciamento</b> .....	54
<b>7.13 Análise Filogenética</b> .....	55
<b>8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	56
<b>9 RESULTADOS</b> .....	57
<b>10 DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>11 CONCLUSÕES</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79
<b>APÊNDICE A – TABELA DE DESCRIÇÃO DAS COLETAS</b> .....	98
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	113

## 1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são infecções causadas por vírus transmitidos por artrópodes, as quais são reconhecidas como um problema global de saúde pública devido à sua distribuição mundial e ineficiência de ações de controle vetorial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017; WEAVER et al., 2018). Entre os anos de 2015 e 2016, o Brasil notificou pela primeira vez a circulação de dois arbovírus: Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV), sendo o primeiro pertencente a família *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), e o outro pertencente à família *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) (CLETON et al., 2012; DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). A circulação desses novos arbovírus foi somada a circulação do vírus Dengue (DENV) no país, levando a uma situação de tríplice epidemia. Ao fim do ano de 2016, foi evidenciada uma alta notificação de dengue (mais de 1,5 milhão de casos), cerca de 270 mil casos de CHIKV (aumento de 85% do número de casos em relação a 2015) e em torno de 215 mil casos de ZIKV (BRASIL, 2016a). Atualmente, esses vírus estão distribuídos por todo território nacional (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

A cocirculação desses arbovírus ampliou o registro de complicações clínicas, como por exemplo, a síndrome hemorrágica de DENV, a síndrome congênita do ZIKV e sintomas crônicos causados pelo CHIKV, que podem ocasionar alta morbidade e mortalidade nos pacientes acometidos (GUZMAN; HARRIS, 2015; KRAUER et al., 2017; RODRIGUEZ-MORALES et al., 2016). Uma das dificuldades na compreensão da real incidência das arboviroses e sua crescente dispersão é a subnotificação dos casos e diagnóstico impreciso (HALL et al., 2012), uma vez que as infecções podem se apresentar de forma assintomática e com sintomatologia comum a outras patologias (dores, náuseas, vômitos e febre). A exceção à regra é a infecção por CHIKV, cujos sintomas reumatológicos são considerados característicos e os problemas oculares ocasionados pela infecção por ZIKV (CHANG et al., 2018; MARQUEZAN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos de competência e vigilância vetorial já demonstraram que as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* participam da transmissão de DENV, ZIKV e CHIKV (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; GUBLER, 2011; VEGA-RUA et al., 2015). Em contrapartida, até pouco tempo se tinha como informação que o mosquito *C. quinquefasciatus* apresentava competência para transmitir ZIKV em laboratório (GUEDES et al., 2017a; GUO et al., 2016; SMARTT et al., 2018), porém esse mosquito já foi encontrado na natureza infectado com ZIKV (ELIZONDO-QUIROGA et al., 2017; GUEDES et al., 2017a).

Diante do cenário encontrado no Brasil, onde continuamente são registradas altas densidades de populações vetoriais e as condições socioeconômicas são favoráveis à incidência de doenças tropicais, a vigilância entomológica, realizada através do xenomonitoramento vetorial, constitui em uma ferramenta promissora, capaz de contribuir para obter melhores resultados nos programas de vigilância para arboviroses (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). No Brasil, esse tipo de investigação tem sido realizado esporadicamente por alguns grupos de pesquisa, e não foi incorporada como uma atividade de rotina em programas de vigilância (AYLLON et al., 2017; GUEDES et al., 2010; GUEDES et al., 2017a). Para serem eficazes, as estratégias de controle de vetores devem ser proativas e não reativas. Sendo assim, a busca de ferramentas para prevenir a expansão dos vírus na população humana é o caminho para prevenção de epidemias. Adicionalmente, alguns vírus apresentam um curto período de viremia detectável em pacientes humanos, o que dificulta seu isolamento para estudos posteriores. Entretanto, no vetor, estes vírus sofrem amplificação e podem ser isolados durante um período mais longo, ou até mesmo, por todo o tempo de vida do mosquito após sua infecção (VYTHILINGAM et al., 2016).

Neste contexto, este projeto teve como principal objetivo avaliar a presença de DENV, ZIKV e CHIKV em populações naturais de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* oriundos de localidades que possuem notificações de casos de arboviroses.

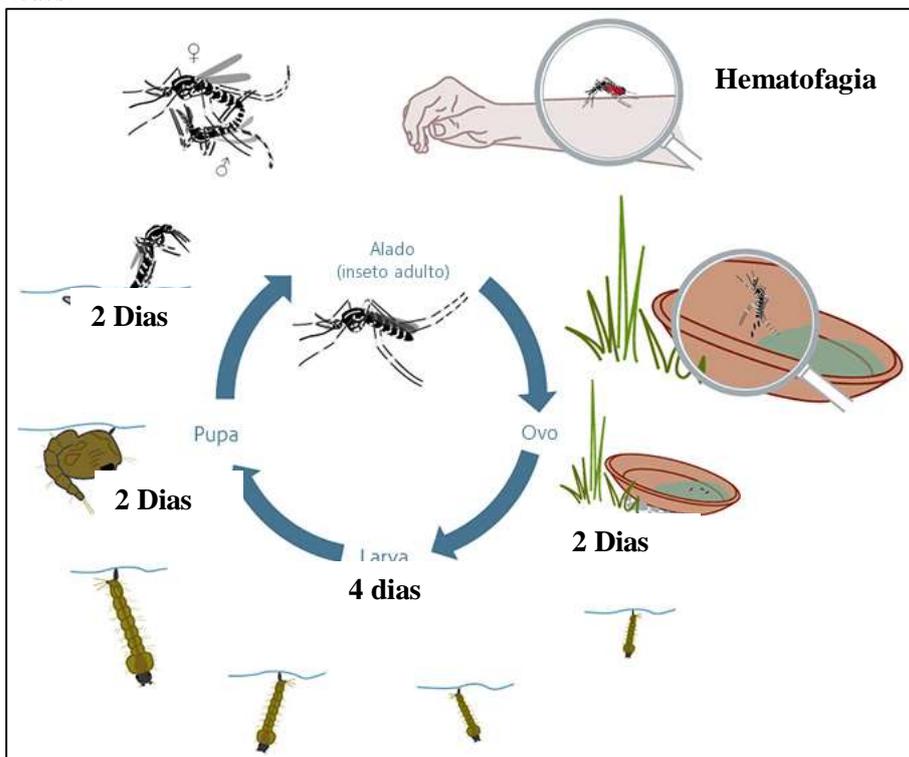
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

No presente referencial teórico serão abordados os principais tópicos relacionados a temática desenvolvida no estudo em questão.

### 2.1 Mosquitos do gênero *Aedes*

Mosquitos do gênero *Aedes* pertencem à família Culicidae, subfamília Culicinae. Estes insetos constituem um grupo de espécies implicadas na transmissão de uma diversidade de vírus que causam problemas de saúde pública no mundo (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Estes indivíduos apresentam um ciclo de desenvolvimento que inclui as fases de ovo, quatro estádios de larva (L1, L2, L3, L4), pupa e adultos (Figura 1). A duração de cada estágio larval pode variar de acordo com as características do ambiente, como por exemplo: a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro. Em média, todo o desenvolvimento do mosquito desde a fase de ovo até a adulta, dura 10 dias (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994).

**Figura 1-** Esquema apresentando o ciclo de desenvolvimento de mosquitos do gênero *Aedes*.

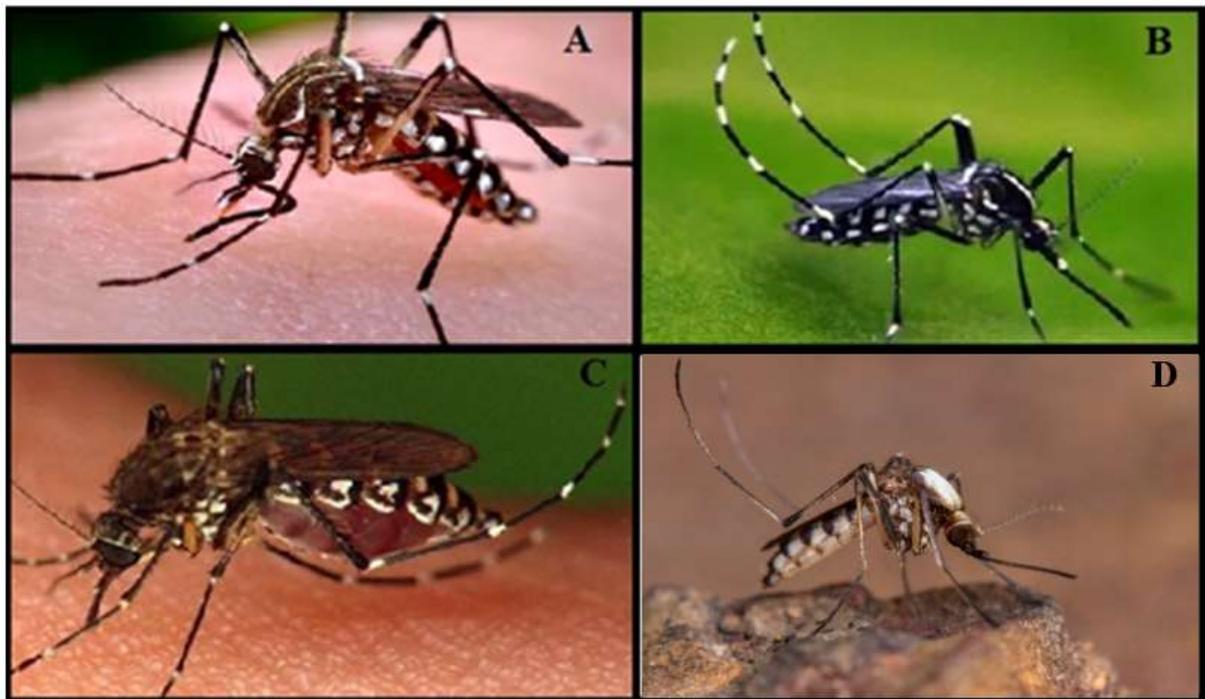


Fonte: São Paulo (2019).

### 2.1.1 *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762

*A. aegypti* (Figura 2A), pertencente ao subgênero *Stegomyia*, é proveniente da África subsaariana e atualmente se encontra distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do globo (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994; KRAEMER et al., 2015). Indivíduos adultos se alimentam de substâncias açucaradas, como néctar, e apenas as fêmeas são consideradas hematófagas e antropofílicas, uma vez que possuem preferência pelo repasto sanguíneo em humanos (GUBLER, 2011; SCOTT et al., 1993). Estas fêmeas depositam seus ovos preferencialmente em criadouros artificiais e temporários, como por exemplo, caixas d'água, pneus em desuso, pequenos recipientes com água e vasos de plantas (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994; GUBLER, 2011). Esses hábitos favorecem a sua presença em cidades com alto grau de urbanização (GUBLER, 2011).

**Figura 2-** Fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*



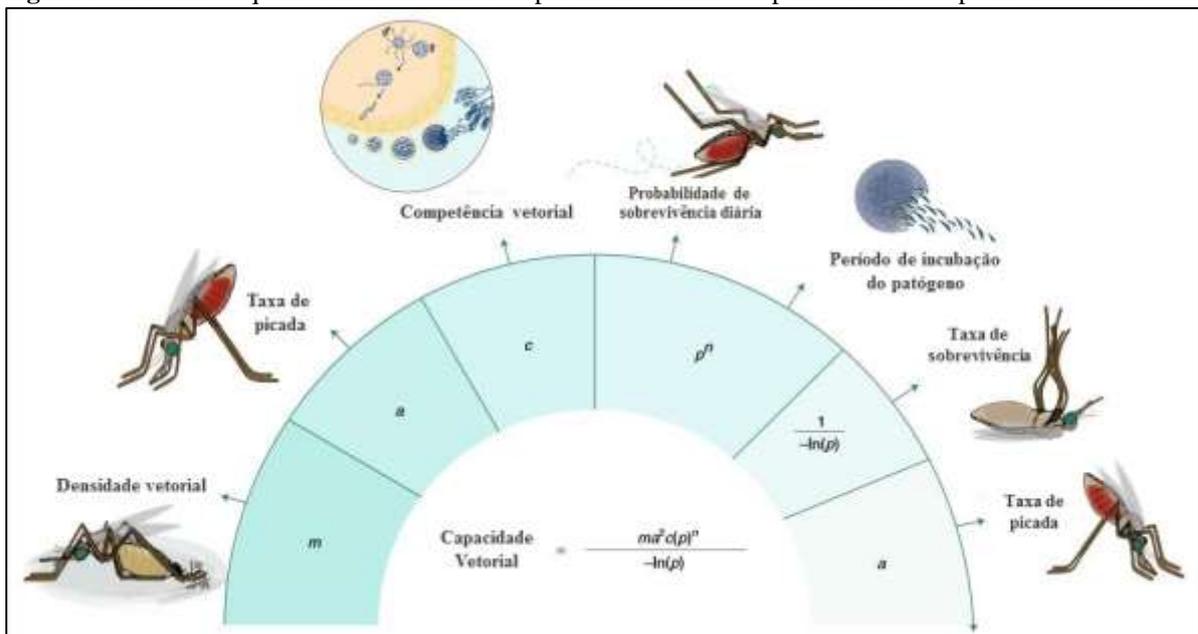
**Fonte:** South Bend (2019); Flórida (2019) e Califórnia (2019).

**Legenda:** A- Fêmea de *A. aegypti* durante o repasto sanguíneo; B- Fêmea de *A. albopictus*; C- Fêmea de *A. taeniorhynchus* durante o repasto sanguíneo; D- Fêmea de *A. scapularis*.

A capacidade vetorial de um inseto é definida pela taxa de eficiência de transmissão de um patógeno pelo seu vetor. Essa capacidade é avaliada através de uma equação que envolve

vários parâmetros que diferem drasticamente entre espécies de vetores, tais como as interações estabelecidas com o ambiente, o patógeno e o hospedeiro (Figura 3) (MARQUARDT, 2004; SHAW; CATTERUCCIA, 2018). A competência vetorial é um dos fatores determinantes da capacidade vetorial, sendo definida como a capacidade biológica inata do inseto vetor em transmitir determinado patógeno (FRANZ et al., 2015; SHAW; CATTERUCCIA, 2018). Para um vetor ser considerado competente, precisa permitir o desenvolvimento do patógeno ingerido por ocasião de um repasto sanguíneo feito em um hospedeiro infectado e após alguns dias, tornar-se capaz de transmitir para outro hospedeiro. No entanto, para o patógeno para ser transmitido, este precisa ultrapassar algumas barreiras do corpo do inseto: a barreira de infecção do intestino médio (MIB), a barreira de escape do intestino médio (MEB), a barreira de infecção da glândula salivar (SGIB) e a barreira de escape da glândula salivar (SGEB) (FRANZ et al., 2015).

**Figura 3-** Desenho esquemático descrevendo os parâmetros utilizados para calcular a capacidade vetorial.



**Fonte:** SHAW & CATTERUCCIA (2018, tradução nossa).

Esta espécie é considerada vetora primária de inúmeros arbovírus, dos quais destacam-se DENV, CHIKV e ZIKV, além de transmitir outros vírus, como Febre Amarela (YFV), Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV) (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956; GÖERTZ et al., 2017; LI et al., 2012; POWELL; TABACHNICK, 2013). A capacidade de *A. aegypti* de transmitir arbovírus é agravada devido ao seu hábito urbano, alta antropofilia, elevada densidade populacional em centros urbanos e capacidade de realizar repastos sanguíneos

sequenciais em diferentes indivíduos (POWELL; TABACHNICK, 2013; ZARA et al., 2016). Assim, a interação desses fatores com a competência vetorial desse mosquito é importante para determinar a sua alta capacidade vetorial (SHAW; CATTERUCCIA, 2018).

### 2.1.2 *Aedes albopictus*, Skuse, 1895

*A. albopictus* (Figura 2B), pertencente ao subgênero *Stegomyia*, é originário da Ásia e tem hábitos silvestres e rurais, com capacidade de tolerar baixas temperaturas (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Essa espécie se alimenta de néctar e, diferente do *A. aegypti*, é eclético com relação à preferência do hospedeiro, podendo se alimentar de sangue de diversos animais silvestres. Esses mosquitos possuem como criadouros preferenciais os naturais, como por exemplo; folhas, cascas de frutas e troncos de árvores. Com a constante aproximação humana a áreas de mata, seja por turismo, trabalho ou moradia, o contato entre indivíduos desta espécie com a população humana é favorecido (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Além disso, vários estudos já relataram a presença dessa espécie em áreas urbanas do Brasil (HONÓRIO et al., 2003; MARTINS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2018).

Estudos sobre competência vetorial demonstram que *A. albopictus* também é capaz de replicar e transmitir os vírus DENV, ZIKV e CHIKV (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; GUBLER, 2011; VEGA-RUA et al., 2015). Este mosquito é considerado vetor secundário de tais arbovírus, visto que possui hábito mais silvestre e não se alimenta exclusivamente de sangue humano (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994; GUBLER, 2011). Porém, indivíduos desta espécie foram apontadas como vetor primário de CHIKV em surtos registrados em regiões da África (DELATTE et al., 2008; PAGÈS et al., 2009).

### 2.1.3 *Aedes taeniorhynchus*, Wiedemann, 1821

A espécie *A. taeniorhynchus* (Figura 2C), pertencente ao subgênero *Ochlerotatus*, é encontrada nas Américas, predominantemente em regiões litorâneas, com maior incidência na Flórida, Estados Unidos, além das Antilhas e Ilhas Galápagos. No Brasil, essa espécie é encontrada em todos os estados brasileiros da região litorânea (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994; REY et al., 2012). As fêmeas desta espécie apresentam um padrão de hematofagia eclético e podem realizar repasto sanguíneo em humanos, outros mamíferos e alguns répteis (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Os criadouros de *A. taeniorhynchus* são transitórios e com um alto grau de salinidade, tais como, poças d'água e valas de drenagem (HRIBAR; DEMAY;

LUND, 2010). Os adultos possuem grande capacidade de voo e podem ser encontrados em locais distantes dos criadouros (VLACH et al., 2006).

O mosquito *A. taeniorhynchus* pode ser vetor de vírus causadores de diferentes encefalites, com capacidade de transmitir o vírus da Encefalite Equina Oriental (EEEV) (ORTIZ; WEAVER, 2004), vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) (NAYAR; ROSEN; KNIGHT, 1986) e do Oeste do Nilo (WNV) (EASTWOOD et al., 2013).

#### 2.1.4 *Aedes scapularis*, Rondanni, 1848

O mosquito *A. scapularis* (Figura 2D), pertencente ao subgênero *Ochlerotatus*, é distribuído pelas Américas do Sul, Central e Norte, com predominância na América do Sul Oriental (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Essa espécie é encontrada em regiões de mata e está distribuída em florestas brasileiras, e ocasionalmente em ambientes de circulação humana (MADEIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2015). As fêmeas põem ovos em diversos tipos de criadouros, tais como aqueles terrestres e transitórios, como por exemplo; poças d'água e alagados, bem como criadouros artificiais, como valas de drenagem (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Esta espécie de mosquito é capaz de transmitir o vírus Rocio (ROV) (MITCHELL; FORATTINI, 1984), EEEV e YFV, que acometem o homem e animais (ARNELL, 1976; FORATTINI et al., 1995).

## 2.2 *Culex quinquefasciatus*, Say, 1823

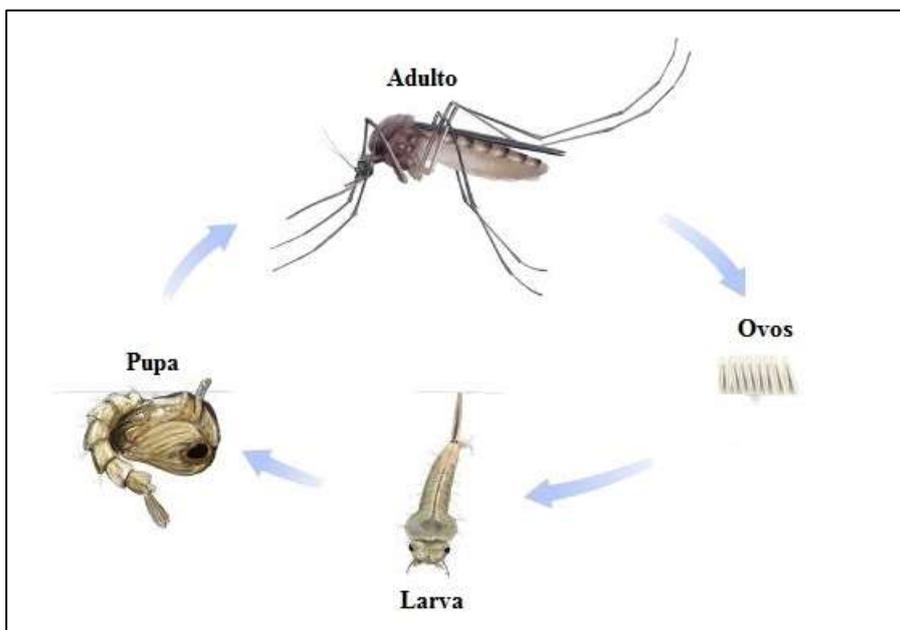
A espécie *C. quinquefasciatus* pertence à família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Culex*, e sua distribuição geográfica é prevalente em áreas tropicais e subtropicais do globo (ANDREADIS, 2012). As fêmeas colocam os ovos flutuantes na superfície da água, no formato semelhante a jangadas (agregados) (Figura 4), em criadouros naturais ou artificiais com alto teor de material orgânico. O ciclo de vida de *C. quinquefasciatus* é considerado rápido, em média 45 dias (Figura 4) (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Assim como os mosquitos do gênero *Aedes*, machos e fêmeas (Figura 5) e se alimentam de néctar e apenas as fêmeas são hematófagas, condição necessária para maturação de seus ovos (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994).

Esses mosquitos são conhecidos por transmitirem parasitas nematoides, como *Wuchereria bancrofti*, principal agente etiológico da filariose linfática (MANIMEGALAI; SUKANYA, 2014). Atualmente, no Brasil, a filariose linfática é considerada endêmica no

estado de Pernambuco, com foco de transmissão de *Wuchereria bancrofti* em Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista, municípios que fazem parte da Região Metropolitana de Recife (FONTES et al., 2012).

Além de nematoides, *C. quinquefasciatus* é considerado o principal vetor de WNV no leste dos Estados Unidos (CAMPBELL et al., 2002; TURELL, 2012), assim como do vírus da encefalite Saint Louis (SLEV) (RICHARDS et al., 2009) e do vírus Sindbis (SINV) (JUPP; MCINTOSH; BLACKBURN, 1986). Recentemente, essa espécie foi incriminada como possível vetor de ZIKV e a competência vetorial foi demonstrada experimentalmente em laboratório (GUEDES et al., 2017a; GUO et al., 2016; SMARTT et al., 2018). *C. quinquefasciatus* já foi encontrado naturalmente infectado com ZIKV, o que sugeriu o envolvimento desta espécie na transmissão em ambiente urbano no Brasil (AYRES et al., 2019; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2017; GUEDES et al., 2017a), a identificação de mosquitos naturalmente infectados com ZIKV também foi comprovada em outras espécies do gênero como *C. coronator*, *C. tarsalis* e *C. perfuscus* (DIALLO et al., 2014; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2017).

**Figura 4-** Ciclo de desenvolvimento de *Culex quinquefasciatus*.



**Fonte:** Petaling Jaya (2019, tradução nossa).

**Figura 5-** Fêmea de *Culex quinquefasciatus* no momento do repasto sanguíneo.



Fonte: South Bend (2019).

## 2.3 Os arbovírus

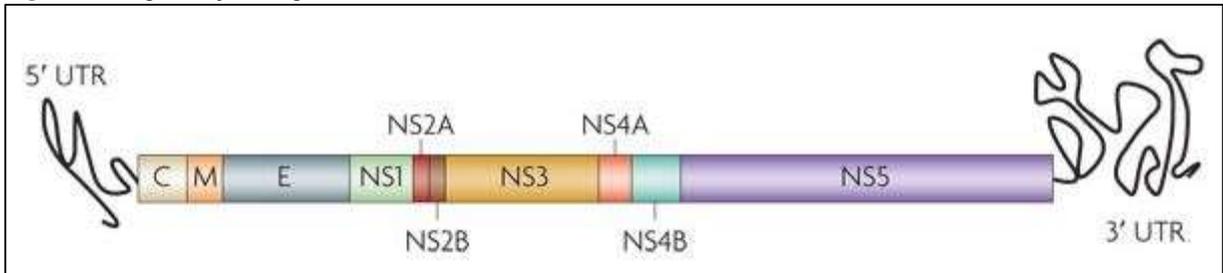
Os arbovírus (Arthropod-borne virus) são vírus que utilizam pelo menos dois hospedeiros, um vertebrado e um artrópode hematófago para completar o ciclo de vida (RUST, 2012). Esses vírus englobam membros de oito famílias virais e 14 gêneros (CLETON et al., 2012), porém, a maioria dos arbovírus de importância para a saúde pública pertence a três famílias: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae* (CLETON et al., 2012).

### 2.3.1 *Flavivirus*

Os vírus desse gênero possuem estrutura simétrica icosaédrica e sua partícula viral mede entre 40 a 60 nm de diâmetro (GUZMAN et al., 2010). O genoma dos *Flavivirus* é formado por RNA de fita simples de polaridade positiva com tamanho em torno de 11 kb (SANTOS, 2008). Esse gênero apresenta grande plasticidade genética em seu RNA, o que permite uma maior adaptação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados (COFFEY et al., 2013). A estrutura de capsídeo proteico dos *Flavivirus* é envolta por um envelope lipídico, onde estão inseridas três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), proteína de membrana (M) e espículas de glicoproteínas (E), que estão relacionadas a resposta imune protetora, indução a anticorpos neutralizantes e hemaglutinação de eritrócitos (GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010). Além das proteínas estruturais, o genoma codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Figura 6) que realizam funções reguladoras e de expressão do vírus; como a replicação, virulência e patogenicidade (GUZMAN; HARRIS, 2015; MUSSO;

GUBLER, 2016). Dentre os membros dos *Flavivirus*, serão abordados os vírus DENV e ZIKV devido ao contexto epidemiológico atual.

**Figura 6-** Organização do genoma de *Flavivirus*.



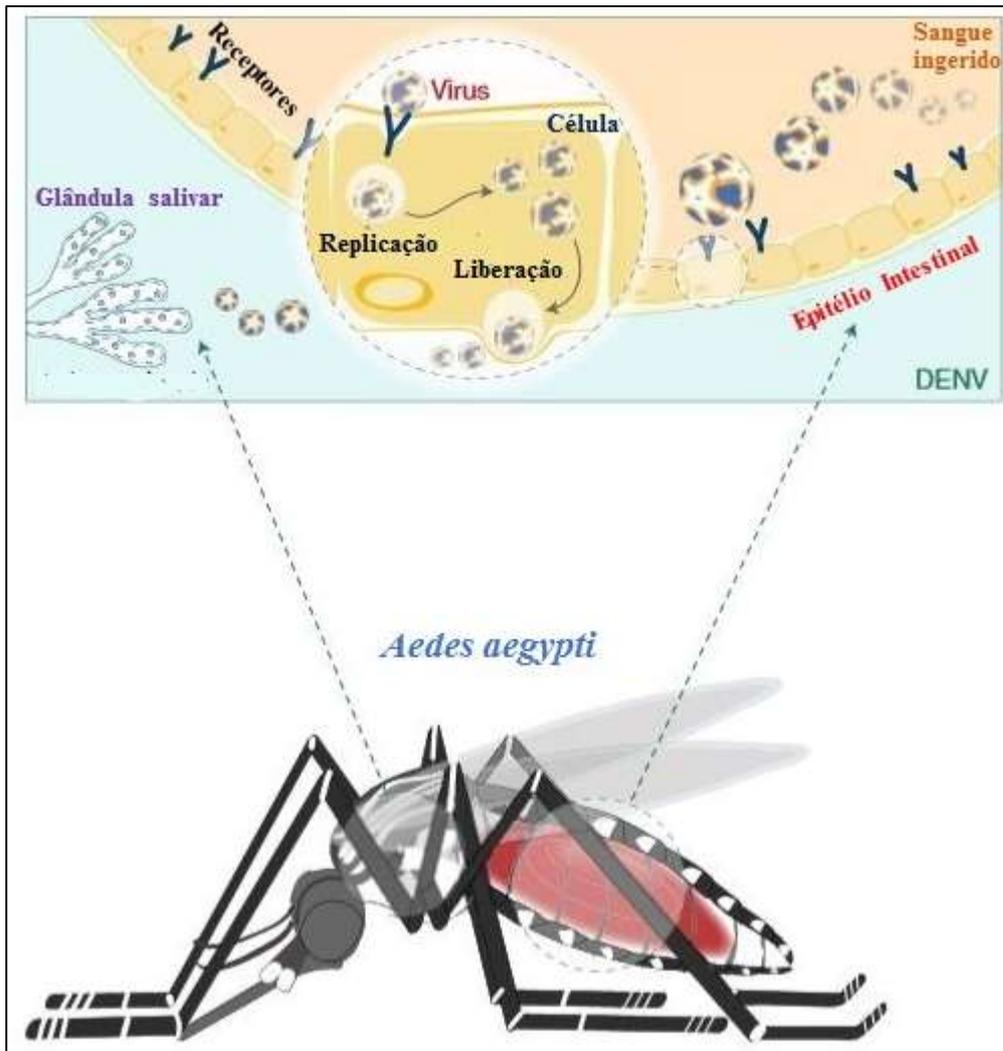
**Fonte:** Guzman et al. (2010).

### 2.3.1.1 Vírus Dengue

O vírus Dengue (DENV), pertence à família *Flaviviridae*, é transmitido por mosquitos durante a alimentação sanguínea em vertebrados (ZARA et al., 2016). Ao todo são descritos quatro sorotipos de DENV (Sorotipos 1, 2, 3 e 4) que são geneticamente e antigenicamente semelhantes. Porém, as diferenças entre os antígenos de cada sorotipo é o que ocasiona a não imunidade após a infecção por um sorotipo aos outros (GUZMAN; HARRIS, 2015; MESSINA et al., 2014; ROTHMAN, 2011).

Uma vez que esse vírus é ingerido por uma espécie de vetor competente passa por um ciclo dentro do mosquito, que envolve ultrapassar várias barreiras anatômicas, fisiológicas e moleculares para se disseminar no organismo do inseto e chegar na glândula salivar, para então ser transmitido (Figura 7) (SHAW; CATTERUCCIA, 2018). O período em que o vírus leva para infectar e replicar nas células do intestino e disseminar até as glândulas salivares, é chamado de período de incubação extrínseca. Em mosquitos *A. aegypti* esse período dura em torno de 8 a 14 dias (PIERSON; DIAMOND; HOWLEY; KNIPE, 2013). Estudos de competência vetorial identificaram a presença de DENV na glândula salivar do mosquito do 7º dia pós-infecção (dpi) até o 21º dpi. Entretanto já foi visto que alguns mosquitos podem transmitir DENV a partir do 3º dpi (PIERSON; DIAMOND; HOWLEY; KNIPE, 2013; SALAZAR et al., 2007). Em espécies de mosquitos não competentes, a infecção por DENV é bloqueada em algum momento do ciclo de infecção ou disseminação viral.

**Figura 7-** Desenho esquemático do ciclo do vírus Dengue dentro do *Aedes aegypti*.



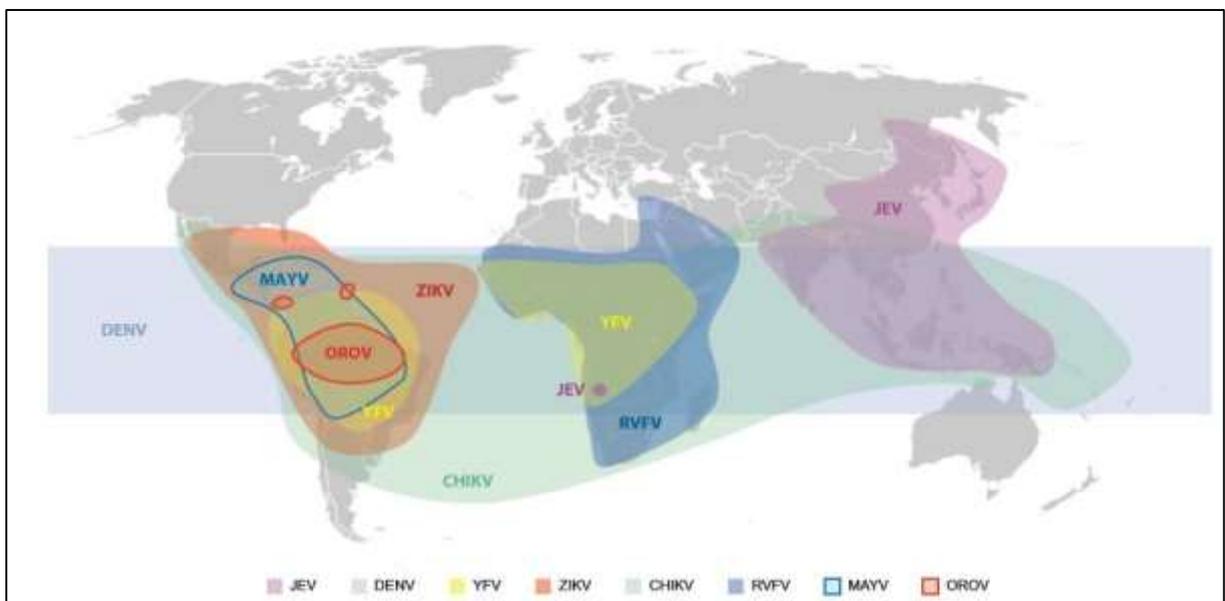
Fonte: SHAW & CATTERUCCIA (2018, tradução nossa).

A dengue é considerada a doença viral transmitida por mosquitos com maior relação de morbidade e mortalidade em humanos (BHATT et al., 2013) (BRASIL, 2012). A doença é endêmica e recorrente em mais de 120 países, com 100 milhões de casos estimados a cada ano e quatro bilhões de pessoas vivendo em áreas consideradas de risco de infecção (Figura 8) (REINER JR et al., 2016) (BRASIL, 2017). Anualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 500.000 pessoas são acometidas pela forma grave da doença e mais de 20.000 delas, cerca de 4%, morrem devido às suas complicações (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Atualmente o vírus está distribuído por todo o Brasil, e os dados disponibilizados pela Secretaria de Saúde do Ministério da Saúde apontam que, só no ano de 2018 foram registrados 265.934 casos prováveis de dengue no país, e destes, 174.724 (65,7%) foram confirmados

(BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019). A região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis (102.284 casos; 38,5 %) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Sudeste (75.421 casos; 28,4 %), Nordeste (67.256 casos; 25,3 %), Norte (18.293 casos; 6,9 %) e Sul (2.680 casos; 1,0 %). Em relação à taxa de incidência (número de casos/100 mil hab.), em 2018, as regiões Centro-Oeste e Nordeste apresentam as maiores taxas de incidência: 635,9 casos/100 mil hab. e 118,5 casos/100 mil hab., respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

**Figura 8-** Mapa de transmissão e cocirculação mundial de arbovírus.



**Fonte:** Adaptado de Weaver et al., (2017).

**Legenda:** **JEV:** vírus da Encefalite Japonesa; **DENV:** vírus Dengue; **YFV:** vírus da febre amarela; **ZIKV:** vírus Zika **CHIKV:** vírus Chikungunya; **RVFV:** vírus da febre do vale Rift; **MAYV:** vírus Mayaro; **OROV:** vírus Oropouche.

O tratamento da dengue é inespecífico e se baseia no manejo dos sintomas, os quais incluem febre, mialgia, cefaleia e complicações hemorrágicas (PITISUTTITHUM; BOUCKENNOOGHE, 2016). A prevenção da doença pode ser feita por meio de imunização vacinal, porém a vacina disponível para DENV (Dengvaxia<sup>®</sup>) apresenta algumas restrições, como a indisponibilidade para o setor público, não ser recomendada a administração em crianças menores de nove anos, possuir baixa eficácia para os sorotipos 1 e 2 e ser indicada para populações com 70% de soroprevalência (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016b). Além disso, estudos mostraram que o uso dessa vacina em pessoas soropositivas na

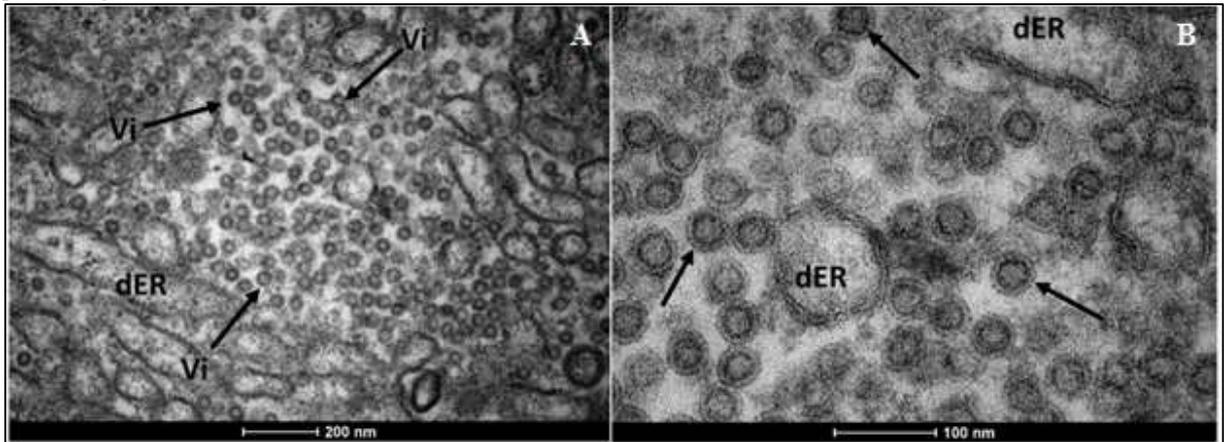
imunização, a proteção foi mantida durante 5 anos de seguimento. No entanto, entre os grupos soronegativos antes da imunização houve um risco maior de dengue grave e internação hospitalar em comparação com controles não vacinados. Sendo assim, a vacina parece aumentar a gravidade da infecção subsequente por dengue (DISEASES, 2018).

### 2.3.1.2 Vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV), *Flavivirus* que também pertence à família *Flaviviridae* (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017) foi isolado pela primeira vez em 1947 de amostras de macacos e a partir de amostras de mosquitos da espécie *A. africanus* em 1948 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O isolamento em amostra de humanos foi realizado pela primeira vez na Nigéria em 1954, com algumas evidências sorológicas de infecção reportadas em outros países africanos e asiáticos (HAYES, 2009). Em 2007, uma epidemia de ZIKV atingiu as ilhas Yap na Micronésia e em 2013, a Polinésia Francesa registrou uma epidemia (CAUCHEMEZ et al., 2016; LANCIOTTI et al., 2008). A partir do cenário epidemiológico observado no Brasil em 2015, bem como a relação da infecção viral com casos de microcefalia em neonatos, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu estado de emergência, com objetivo de combater a circulação do vírus pelo país (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

ZIKV pode ser transmitido por diferentes espécies de mosquitos. Em relação a interação do vírus com espécies do gênero *Aedes*, como *A. aegypti* e *A. albopictus*, após ultrapassar as barreiras do intestino, o vírus tem o período de incubação extrínseca entre 5 a 7 dias (LI et al., 2012). Em relação a espécie *C. quinquefasciatus*, o vírus pode ser detectado na glândula salivar a partir do 7º dpi (GUEDES et al., 2017a) (Figura 9).

**Figura 9-** Cortes celulares de glândula salivar de *Culex quinquefasciatus* infectado com o vírus Zika no 7º dia pós infecção.



**Fonte:** Adaptado de Guedes et al. (2017).

**Legenda:** Cortes Ultrafinos de 70 nm. **Vi:** partícula viral de ZIKV formadas; **dER:** Reticulo endoplasmático distendido; **A** – Visualização de numerosas partículas de ZIKV (setas pretas) dentro do dER; **B-** Visualização de partículas de ZIKV (setas pretas) envelopados.

Em humanos, a infecção causada pelo ZIKV geralmente leva ao desenvolvimento de sintomas que variam desde febre, artralgia, conjuntivite até *rash* cutâneo (MUSSO, 2015). No entanto, complicações neurológicas estão relacionadas com a infecção, como por exemplo, alterações congênitas, microcefalia e Síndrome de Guillain–Barré (CORDEIRO et al., 2016; KRAUER et al., 2017; MORON et al., 2016). Tais complicações foram evidenciadas durante a epidemia da doença no Brasil (DE SOUZA et al., 2018; LESSER; KITRON, 2016).

Os primeiros estados brasileiros a registrar casos de infecção por ZIKV foram Bahia e Rio Grande do Norte (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015). Em 2018, até a SE 52, foram registrados 8.680 casos prováveis de doença pelo vírus Zika no país, destes, 3.984 (45,9 %) casos foram confirmados. A região com maior número de casos prováveis foi o Sudeste com 3.149 casos (36,3 %) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Nordeste (2.425 casos; 27,9%), Centro-Oeste (1.733 casos; 20,0 %), Norte (1.326 casos; 15,3 %) e Sul (47 casos; 0,5%). Porém, a análise da taxa de incidência de casos prováveis de Zika (número de casos/100 mil hab.), demonstra que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentam as maiores taxas de incidência: 10,8 casos/100 mil hab. e 7,3 casos/100 mil hab., respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

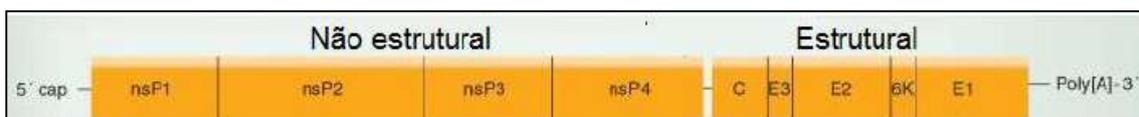
De acordo com o Boletim Epidemiológico de Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionado à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, entre as SEs 45/2015 e 45/2018 (08/11/2015 a 10/11/2018) o número de casos

suspeitos foi de 16.900, dos quais 3.279 (19,4%) foram confirmados e 2.718 (16,1%) permanecem em investigação. O Nordeste foi a região com maior notificação de casos do país (58,6%), seguida das regiões Sudeste (25,0%) e Centro-Oeste (7,5%). Os cinco estados com maior número de casos notificados são Pernambuco (16,4%), Bahia (15,7%), São Paulo (9,7%), Rio de Janeiro (7,0%) e Paraíba (6,9%) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018b).

### 2.3.2 *Alphavirus*

*Alphavirus* possuem capsídeo icosaédrico que mede cerca de 70 nm de diâmetro, e possui genoma composto de RNA fita simples linear de polaridade positiva, de aproximadamente 11 kb. O seu genoma codifica quatro proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4) e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6k e E1) (SANTOS, 2008; SCHUFFENECKER et al., 2006) (Figura 10).

**Figura 10-** Organização do genoma de *Alphavirus*.



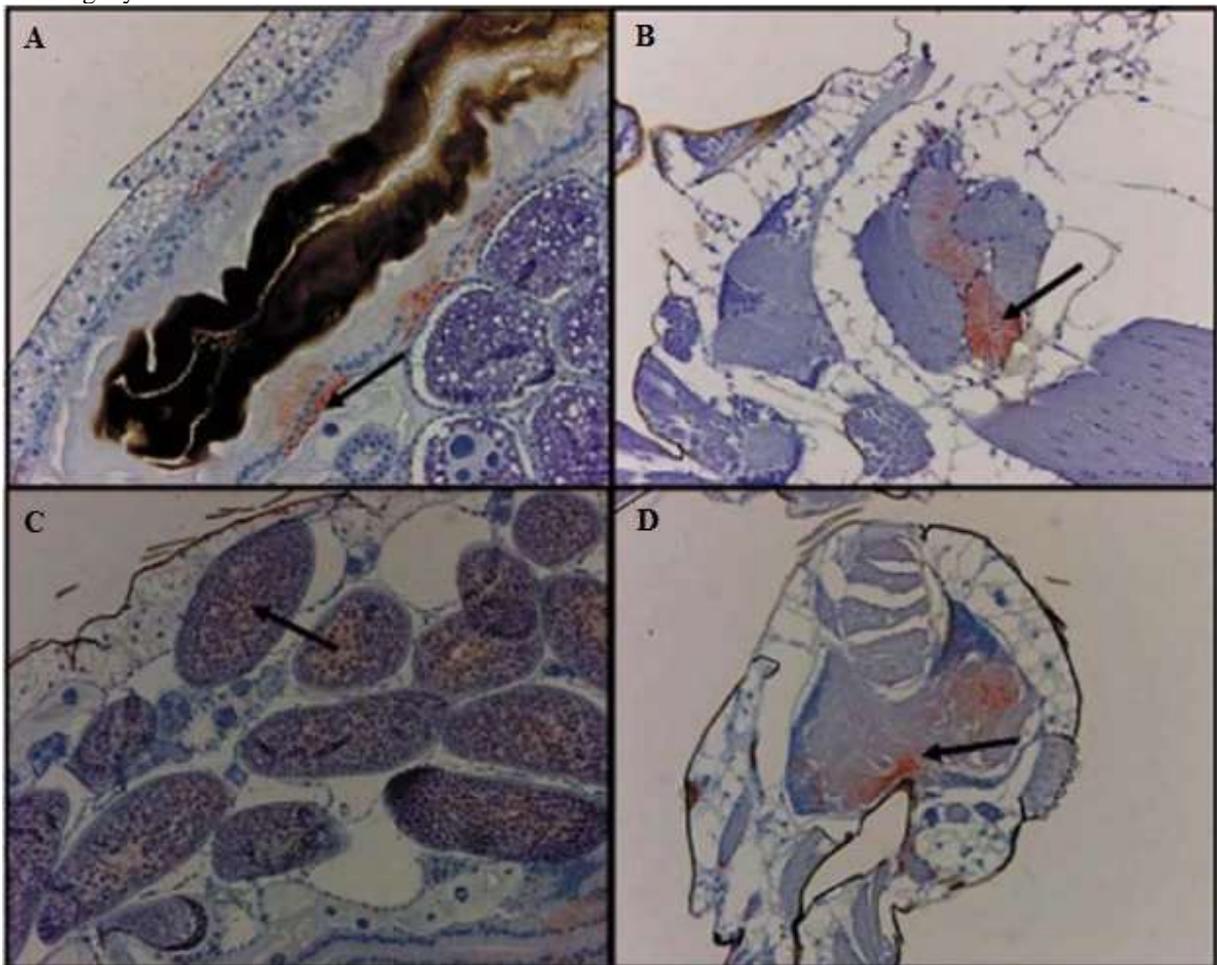
**Fonte:** Weaver (2012, tradução nossa).

#### 2.3.2.1 *Vírus Chikungunya*

O vírus Chikungunya (CHIKV), membro da família *Togaviridae* (CLETON et al., 2012), foi isolado pela primeira vez na década de 50 e, até o ano de 2005, não havia causado surtos ou epidemias, porém, uma epidemia atingiu ilhas do Oceano Índico, como a ilha francesa Reunião, onde houve registro de mais de 240 mil casos e 203 óbitos (BURT et al., 2012; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). Em 2006, epidemias de CHIKV ocorreram na Índia e Ásia e, em 2007, casos autóctones foram reportados na Itália, e em 2010, no sul da França (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). No fim de 2013, o primeiro caso de transmissão autóctone de CHIKV foi registrado nas Américas, na região do Caribe (VAN BORTEL et al., 2014). No final de 2014, países da América do Sul e Central, incluindo o Brasil, já haviam registrado a circulação local do CHIKV (WEAVER et al., 2012) (Figura 8).

O período de incubação extrínseca dos *Alphavirus* dura em média de 4 a 10 dias (GRIFFIN, 2013). Porém, alguns estudos já demonstraram que com apenas dois dias, após a ingestão pelos mosquitos, CHIKV já é detectável na glândula salivar de *A. albopictus* (Figura 11) em títulos suficientes para causar infecção em um hospedeiro vertebrado (VAZEILLE et al., 2007). Essa rápida disseminação pode ser visualizada também nos ovários nos mosquitos infectados após 6 dpi e a permanência do vírus também no intestino do mosquito (Figura 11). A alta competência vetorial do *A. albopictus* é relacionada a mutação encontrada em cepas de CHIKV com a substituição de uma alanina por uma valina na posição 226 do envelope viral (E1-A226V) (SCHUFFENECKER et al., 2006). Em relação à susceptibilidade de *A. aegypti* a infecção por CHIKV, 35 populações diferentes das Américas foram consideradas com alta competência vetorial, onde mais de 60% dos mosquitos de cada população foram capazes de disseminar o CHIKV após atravessar a barreira do intestino médio (VEGA-RUA et al., 2014).

**Figura 11-** Fotos de Preparações imunocitoquímicas de tecidos de *Aedes albopictus* infectados com o vírus Chikungunya.



**Fonte:** Adaptado de Vazeille et al. (2007).

**Legenda:** Imagens capturadas em aumento de 100x. **A** – Intestino no 1º dpi; **B**- Glândulas salivares no 2º dpi; **C**- Ovários no 6º dpi; **D**- Sistema nervoso central no 9ºdpi; **Setas:** Presença de CHIKV nos tecidos.

Atualmente CHIKV está distribuído por todo território nacional e no ano de 2018 foram registrados 87.687 casos prováveis de febre de chikungunya, dos quais 68.962 (78,6 %) foram confirmados. A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de chikungunya (52.966 casos; 60,4%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Centro-Oeste (13.862 casos; 15,8 %), Nordeste (11.287 casos; 12,9 %), Norte (9.315 casos; 10,6 %) e Sul (257 casos; 0,3 %). Porém, em relação à taxa de incidência de casos prováveis de febre de chikungunya (número de casos/100 mil hab.), as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência: 86,2 casos/100 mil hab. e 60,4 casos/100 mil hab., respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

A infecção causada pelo CHIKV produz uma síndrome febril com altas temperaturas e sintomas articulares (WEAVER; LECUIT, 2015). A artralgia afeta até 80% dos pacientes de forma severa que pode persistir por meses ou anos. Essa manifestação clínica pode ocasionar artrite reumatoide, que se desenvolve em aproximadamente 30% dos pacientes de forma crônica com mecanismos ainda desconhecidos (RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2016; MARQUES et al., 2017). Em testes sorológicos, complexos antigênicos podem ser diferenciados, principalmente através de testes de neutralização (POWERS, 2011; STRAUSS; STRAUSS, 1994). Atualmente, não há vacinas prontas para CHIKV, porém duas vacinas para CHIKV estão em fase de ensaio Clínico I (CHANG et al., 2014; RAMSAUER et al., 2015).

## **2.4 Vigilância Epidemiológica**

A vigilância em saúde é um instrumento que pode antecipar e distinguir alterações que influenciam no processo saúde-doença, com objetivo final de prevenir e controlar doenças (BRASIL, 2009). A epidemiologia é o estudo da frequência, da distribuição e dos determinantes dos problemas de saúde em populações humanas e a aplicação desses estudos no controle dos fenômenos relacionados a doenças (BRASIL, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017; ZARA et al., 2016).

A vigilância Epidemiológica é a união entre as duas ferramentas que proporcionam a prevenção, detecção e controle de eventos que possam causar doenças ou agravos na saúde (BRASIL, 2009). O Ministério da Saúde publicou em 2009, o Guia de Vigilância Epidemiológica Nacional, que fornece orientação técnica para os profissionais de saúde que executam as ações de controle (BRASIL, 2009). Dentre seus objetivos está a disponibilização de informações atualizadas e notificação das doenças e agravos, bem como identificar fatores

que as condicionam, numa área geográfica ou população (ZARA et al., 2016). Um dos exemplos é a vigilância epidemiológica das arboviroses, que avalia a distribuição de casos das doenças e medidas de controle, além de fornecer abordagens estratégicas durante epidemias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017; ZARA et al., 2016).

#### 2.4.1 Vigilância Laboratorial

Como parte fundamental da vigilância epidemiológica, a vigilância laboratorial é realizada através de intervenções clínicas e conta com o diagnóstico preciso de arboviroses (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE., 2015). É considerada como crucial para assegurar o tratamento adequado de pacientes, relatar a circulação viral em uma região e permitir o emprego de estratégias, como por exemplo, controle de vetores, vacinação e campanhas de conscientização pública (WEAVER et al., 2018).

Para o diagnóstico de arboviroses, como dengue, Zika e chikungunya, diferentes técnicas são utilizadas. Os testes sorológicos são os mais utilizados para essa finalidade, porém, problemas são relatados, como a falta de especificidade devido à reatividade cruzada entre vírus relacionados e custos para produção individual de cada antígeno viral utilizado (WAGGONER et al., 2016b). O diagnóstico molecular é altamente específico, mas é necessário que seja realizado em período de viremia (termo utilizado para descrever a presença de RNA viral detectável em uma amostra) (WAGGONER et al., 2016a) que para os arbovírus em questão, esse período pode variar de 3 a 7 dias pós surgimento de sintomas (WEAVER et al., 2018). A viremia de ZIKV é geralmente mais baixa quando comparada com DENV e CHIKV. A cocirculação de DENV, ZIKV e CHIKV representa um grande desafio para o tratamento clínico e diagnóstico laboratorial em áreas endêmicas. Uma vez que pacientes infectados com um ou mais desses vírus podem apresentar manifestações clínicas semelhantes em uma ampla faixa de viremia (WAGGONER et al., 2016b). Além disso, as coinfeções podem ser bastante comuns, exigindo que todos os pacientes sejam testados para cada vírus. Isso demonstra a necessidade de diagnósticos moleculares *multiplex* (para todos os vírus) sensíveis e precisos para atendimento clínico, pesquisa de doenças e vigilância das arborivoses (WAGGONER et al., 2016b). Atualmente, para essas infecções, a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é o principal teste para a detecção de ácido nucleico viral, presente no soro do paciente, durante a fase de viremia inicial (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTI,

2016; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). Para ZIKV e CHIKV essa é a técnica considerada padrão-ouro para o diagnóstico (ARAÚJO; FERREIRA; NASCIMENTO, 2016). A urina também pode ser utilizada para a detecção de DENV e ZIKV e, neste caso, a janela de detecção após a viremia é possível por um período mais longo, facilitando o diagnóstico de vírus (GOURINAT et al., 2015; HIRAYAMA et al., 2012).

O diagnóstico laboratorial da infecção por DENV pode ser realizado utilizando as seguintes metodologias: ensaio imunoenzimático (ELISA) por captura de IgM (padrão-ouro), isolamento viral (em camundongos ou cultura de células), imunofluorescência (IFA), inibição de hemaglutinação (IH), teste de fixação de complemento (FC), testes de neutralização, a detecção de ácido nucleico do DENV, através da RT-PCR (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; WANG; SEKARAN, 2010). Testes como ELISA ou imunofluorescência também são utilizados para a confirmação do diagnóstico do ZIKV. No entanto, devido à baixa concentração de anticorpos IgM na fase de incubação, torna-se mais difícil a identificação do vírus no paciente (IOOS et al., 2014) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Para CHIKV, a sorologia é utilizada, mas precisa ser validada para uso em larga escala na população brasileira (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

É de extrema importância para a vigilância epidemiológica que o diagnóstico da doença seja feito de forma rápida, precisa e de baixo custo. Os testes possuem maior custo de acordo com sua especificidade e sensibilidade, como é o caso do isolamento viral e detecção de ácidos nucleicos. A detecção de anticorpos e uso de métodos sorológicos, apesar de mais simples e acessíveis, podem ter sua sensibilidade e especificidade comprometidas devido a probabilidade reação cruzada (LANCIOTTI et al., 2007; WAGGONER; PINSKY, 2016). Entre vírus de uma mesma família é comum que ocorra reação cruzada, como por exemplo entre ZIKV e DENV, o que em locais com cocirculação de arbovírus pode acarretar em resultados falsos positivos. Esses resultados sorológicos já foram considerados pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) insuficientes para fechar diagnóstico conclusivo para arboviroses (FANTINATO et al., 2016; LEE et al., 2017; WAGGONER et al., 2016a).

#### 2.4.2 *Vigilância Entomológica*

A vigilância entomológica tem como finalidade identificar e monitorar, de forma sistemática, os fatores de risco decorrente da exposição do homem ao inseto vetor do agente

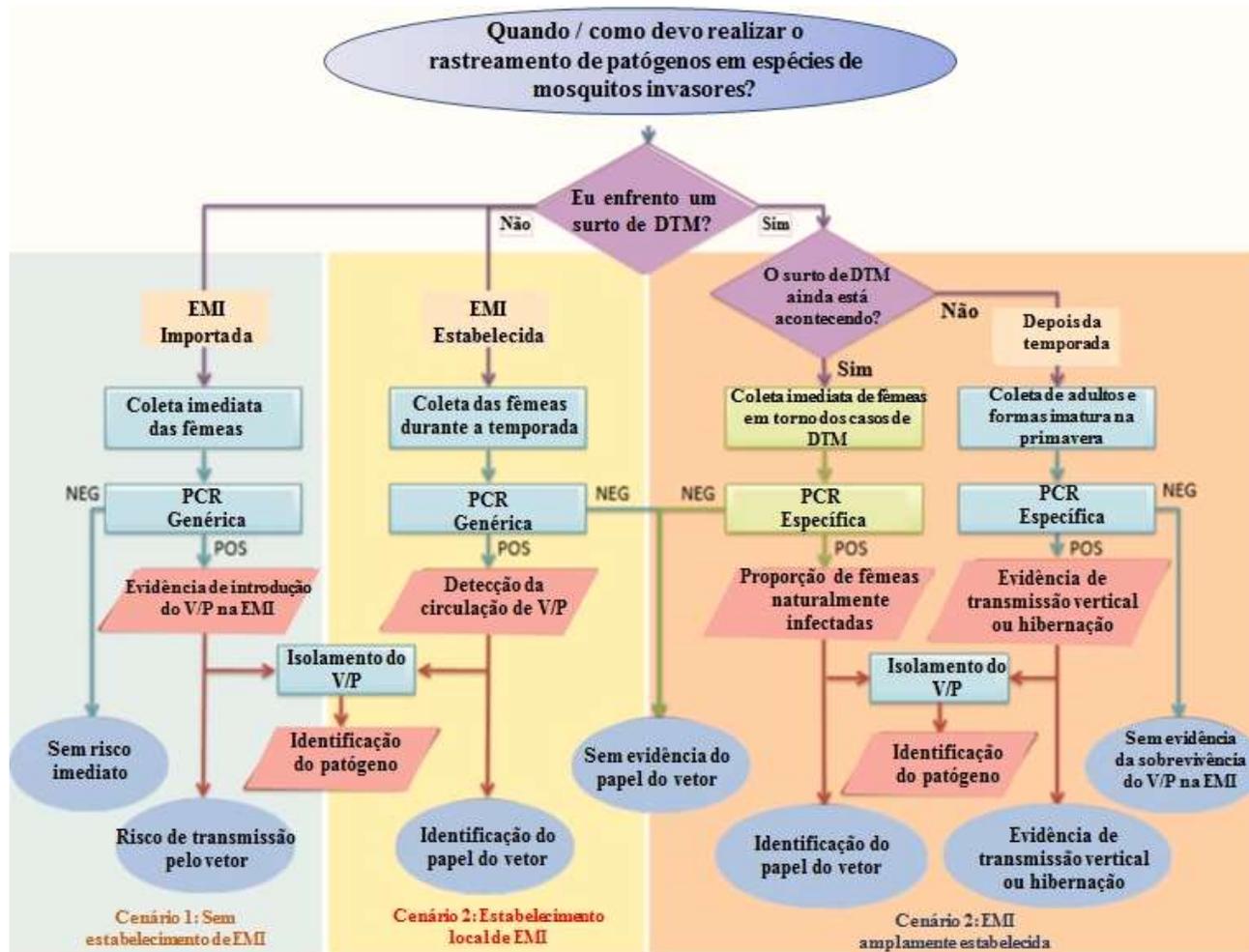
causador de doença e baseia-se em técnicas que contribuem para uma ampla variedade de objetivos, dentre eles: estimar a densidade populacional, comportamento, distribuição dos insetos vetores, monitorar o status de susceptibilidade aos inseticidas usados, e detectar precocemente e/ou avaliar o aumento da circulação de patógenos nas populações de vetores (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Assim, este tipo de vigilância se torna uma ferramenta essencial para o planejamento de programas de controle de vetores e de doenças causadas pela transmissão de agente patogênicos (arboviroses por exemplo) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017; WEAVER et al., 2018). Além de avaliar o impacto dessas intervenções em diferentes regiões de maneira que as ações possam ser direcionadas para as regiões que apresentem altas densidades de mosquitos ou elevado número de notificação de casos de arboviroses (HALL et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017; ZARA et al., 2016)

A vigilância entomológica através da coleta de ovos e larvas, realizada em criadouros naturais e artificiais, bem como da coleta de adultos encontrados em locais intra e peridomiciliar, por meio de armadilhas e aspiradores de mosquitos, é a principal forma de avaliar a densidade populacional de mosquitos. Além disso, a associação desse monitoramento à técnicas moleculares, como a RT-PCR e isolamento viral tem tornado a vigilância entomológica uma ferramenta eficiente para identificação de localidades com circulação viral (BRAGA; VALLE, 2007; ZARA et al., 2016). Porém, como demonstrado em estudos anteriores, a vigilância vetorial não deve ser feita apenas em períodos epidêmicos, mas também durante períodos interepidêmicos, visto que alguns vírus permanecem na natureza mesmo sem a notificação das doenças (Figura 12). Dessa maneira, é possível avaliar a transmissão residual, conhecer o papel dos vetores e aumentar a possibilidade de prevenção, antes do surgimento de casos da doença em humanos (GUEDES et al., 2010; HALL et al., 2012; ZARA et al., 2016). Em vários locais com risco de transmissão de arbovírus, investigação da presença viral em mosquitos tem sido empregada por alguns grupos (ELIZONDO-QUIROGA et al., 2017; FAUVER et al., 2015; HUERTA et al., 2017), uma vez que esse processo é custoso e necessita de uma rede integrada de coletas, além da rápida divulgação de resultados. No Brasil, alguns grupos estão incorporando este tipo de investigação como atividade de rotina em pesquisa (BARBOSA et al., 2016; GUEDES et al., 2010; GUEDES et al., 2017a; MACIEL-DE-FREITAS; VALLE, 2014).

O uso de cartões de papel, FTA® *card* (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA), com iscas de açúcar é uma ferramenta de baixo custo que foi desenvolvida para o

monitoramento de arbovírus em populações de mosquitos de campo. Essas iscas possibilitam a coleta de saliva e, caso essa saliva esteja infectada com algum vírus, o genoma viral é mantido no cartão mesmo que permaneça em campo por um período longo sem degradar o RNA (HALL-MENDELIN et al., 2017). O uso de FTA *cards* com isca de açúcar já foi empregado como método de vigilância na Austrália, onde foi detectada a circulação dos vírus Ross River, Barmah Forest e Stratford (FLIES et al., 2015). Nos Estados Unidos, essa ferramenta também foi utilizada e foi visto que a investigação de WNV e do vírus da Encefalite de Saint Louis (SLV) utilizando iscas de açúcar mostrou ser mais eficiente do que o monitoramento através de mosquitos adultos, onde a positividade das iscas utilizadas foi 100 vezes maior do que a busca em adultos (STEINER et al., 2018). Sendo assim, integração de diferentes abordagens na vigilância entomológica, considerando as tecnologias disponíveis e as características regionais específicas, é uma ferramenta viável para avaliação da redução populacional dos mosquitos e monitoramento dos arbovírus circulantes (HALL et al., 2012; ZARA et al., 2016).

**Figura 12:** Árvore de decisão para triagem de patógenos (vírus / parasita) em espécies de mosquitos invasoras com procedimentos, conjuntos de dados e resultados esperados.



**Fonte:** Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças, (2012, tradução nossa).

**Legenda:** EMI- Espécie de mosquito invasora; DTM- Doença transmitida por mosquito; V- Vírus; P- Parasita; NEG- Negativo e POS- Positivo.

### 3 JUSTIFICATIVA

No Brasil, apesar dos esforços empenhados nos programas de controle vetorial, fatores como a urbanização descontrolada, infraestrutura sanitária inadequada e intenso fluxo populacional tem favorecido o crescimento das populações de mosquitos no país. A detecção de vírus em mosquitos de campo representa um dos critérios para a incriminação de uma espécie como vetor.

A investigação molecular proposta nesse estudo é importante para compreender a dinâmica de circulação dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV na Região Metropolitana do Recife (RMR), em diferentes espécies de mosquitos. Além disto, a detecção desses arbovírus permite conhecer a evolução e filogenia das cepas detectadas em campo, para que seja possível esclarecer a introdução desses vírus nas diferentes regiões. A investigação em períodos interepidêmicos, e não apenas durante as epidemias, é crucial para identificar locais e/ou regiões onde a circulação viral ainda está ativa, o que pode contribuir para uma intensificação das ações de controle e redução do contato entre a população de mosquitos infectados e a população hospedeira.

Desta forma, investigar o papel de outras espécies que não são consideradas vetores primários ou que não são comumente investigadas no ciclo de transmissão dos arbovírus é de extrema importância, uma vez que os vírus evoluem muito rápido e podem sofrer adaptações a novas espécies. Adicionalmente, a obtenção de isolados de vírus em amostras de mosquitos de campo pode contribuir para estudos de desenvolvimento de vacinas e kit diagnósticos.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Quais arbovírus de importância médica circularam na Região Metropolitana de Recife e em quais espécies de mosquitos coletados entre 2015 e 2017?

## **5 HIPÓTESE**

Os arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV circularam na RMR entre 2015 e 2017 em diferentes espécies de mosquitos.

## 6 OBJETIVO GERAL

Avaliar a circulação de arbovírus de importância médica em mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex* provenientes de localidades com notificações de dengue, Zika e chikungunya.

### 6.1 Objetivos específicos

- a) Conhecer a taxa de infecção viral em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* provenientes de áreas com notificação de pacientes com sintomas de arbovirose;
- b) Comparar as taxas de infecção natural por arbovírus nas espécies de mosquitos estudadas;
- c) Isolar cepas virais a partir de amostras de mosquitos;
- d) Analisar a origem dos vírus encontrados;
- e) Identificar regiões de maior circulação de vírus e avaliar a associação com indicadores sociais de maior risco de transmissão no Estado;

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

Na presente seção do trabalho serão descritos os processos metodológicos utilizados para o desenvolvimento dos objetivos propostos.

### 7.1 Área de estudo

O estudo foi realizado com 236 pontos de coleta em seis municípios da Região Metropolitana do Recife (RM): Recife, Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Camaragibe, Paulista e São Lourenço da Mata. De modo geral, o clima nesses municípios é predominantemente quente e úmido, com temperatura que varia de 25 °C a 32 °C. A RMR possui vegetação diversificada, com focos de Mata Atlântica e manguezais. A maioria dos pontos de coleta se concentrou na capital do estado, a cidade de Recife, que possui 1.537.704 habitantes e 218,435 km<sup>2</sup> de área (IBGE, 2010) (Figura 13).

**Figura 13-** Mapa da Região Metropolitana de Recife com a distribuição espacial dos pontos coletados.



**Fonte:** A autora a partir do ArcGIS.

## 7.2 Coletas e separação de mosquitos

Os mosquitos foram coletados por busca ativa em residências, ruas, Hospitais e Unidades de Pronto Atendimento (UPA) em que haviam notificação de casos de arboviroses confirmados ou não. O instrumento de coleta utilizado foi o aspirador de mosquitos (HORST®) (Figura 14A), cuja função é fazer a sucção suave dos mosquitos que estejam em repouso ou em voo sem causar-lhes danos. As primeiras coletas foram realizadas no município de São Lourenço da Mata no ano de 2015, no âmbito de outro projeto que visava estudar a variabilidade genética das populações de vetores do município. Com o início da epidemia, as coletas foram direcionadas para a RMR e feitas em parceria com a Secretaria Estadual de Pernambuco (SES). As coletas de mosquitos em hospitais e UPAs foram realizadas pela equipe da SES e as demais realizadas em residências foram feitas pela equipe de campo do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM).

As amostras de mosquitos analisadas neste estudo foram coletadas no período entre janeiro de 2015 e dezembro de 2017. Após cada coleta de mosquitos, estes foram levados vivos, em sacos de contenção (Figura 14B) para o Laboratório de Entomologia, no próprio saco coletor os mosquitos foram adormecidos por resfriamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, identificados e separados de acordo com a localidade, espécie, sexo e estado alimentar. Estes mosquitos foram separados em grupos de até 10 indivíduos (*pools*), acondicionados em microtubos de 1,5 ml e em seguida estocados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Toda a triagem foi realizada em placas de petri sobre gelo, utilizando pinças descontaminadas com álcool (70%).

**Figura 14-** Coleta de mosquito utilizando aspiradores e saco de contenção de amostra com mosquitos vivos.



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Integrante da equipe de campo do IAM utilizando aspirador; B- Saco de aspiração com mosquitos vivos.

### 7.3 Preparação do macerado de mosquitos (homogenato)

Para a preparação do homogenato de mosquitos, foram acrescentados a cada *pool* 300  $\mu$ l do meio de cultura Leibovitz (L-15) suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 1% de antifúngico (Fungizon) e antibióticos (Penicilina/Streptomicina). A maceração foi realizada com pistilos autoclavados e macerador automático (Sigma) até completa homogeneização dos mosquitos e meio de cultura. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 2.000 rpm, por 15 min a 4 °C, e do sobrenadante foi separada uma alíquota de 100  $\mu$ l para posterior extração de RNA e os 200  $\mu$ l restantes foram armazenados a -80 °C para posterior isolamento viral através de inoculação em cultura de células.

### 7.4 Cepas virais utilizadas

Os experimentos foram realizados utilizando os isolados virais cedidos gentilmente por Dra. Marli Tenório, colaboradora do Departamento de Virologia (LAVITE) do IAM. As cepas utilizadas como controles positivos para os procedimentos descritos nos itens 7.7, 7.10 e 7.11

foram ZIKV BRPE243/2015 (KX197192), CHIKV BRPE408, DENV-1 42735/BR-PE (EU259529), DENV-2 3808/BR-PE (EU259569), DENV-3 85469/BRPE (EU259607) e DENV-4 1385 (U18425). Os estoques virais de ZIKV e CHIKV foram mantidos e titulados em célula Vero, enquanto que os de DENV foram mantidos e titulados em célula C6/36.

### **7.5 Extração de RNA**

As extrações de RNA foram realizadas utilizando o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante com modificações conforme descrição a seguir. Uma alíquota de 100 µl do homogenato obtido dos *pools* de mosquitos foi misturada com 200 µl de Trizol (Invitrogen), o microtubo foi agitado durante 15 seg e incubado durante 5 min à temperatura ambiente. À mistura foram adicionados 100 µl de clorofórmio (Sigma), o microtubo foi agitado manualmente durante 15 seg, seguindo de uma incubação a temperatura ambiente durante 3 min e centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. A fase aquosa de cada amostra foi removida e transferida para um novo microtubo contendo 250 µl de isopropanol 100 % (Sigma). As amostras foram misturadas por inversão dos tubos, incubadas em temperatura ambiente por 10 min e depois centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante então foi removido e o sedimento de RNA foi lavado com 300 µl de etanol 75 % (Sigma). As amostras foram agitadas brevemente no vortex e depois centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min a 4° C. Por fim, o sobrenadante foi desprezado, o excesso foi retirado por inversão em papel toalha e o RNA foi então transferido para estufa a 37 °C durante 20 min para secagem do *pellet*. O *pellet* contendo o RNA extraído foi ressuscitado em 30 µl de água livre de DNase e RNase.

### **7.6 Tratamento com DNase**

Após a extração, todos os RNAs foram tratados com DNase (Turbo DNase, Ambion) de acordo com o protocolo descrito a seguir: foi adicionado ao RNA extraído um mix contendo 1 µl de DNase e 3 µl de tampão, a mistura foi então incubada por 40 min a 37 °C em banho-maria. Após a incubação, 4,5 µl de EDTA a 100 mM (Gibco) foram acrescentados em cada amostra, as quais foram incubadas novamente por 10 min a 75 °C. Após tratamento, todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria usando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e a concentração dos RNAs extraídos variou entre 50 ng/µl a 1.000 ng/µl.

## 7.7 Detecção da presença de vírus

A detecção de arbovírus nas amostras de mosquitos foi feita através de dois protocolos distintos. Para DENV e ZIKV foram processados mosquitos de todas as espécies, enquanto que para CHIKV apenas mosquitos do gênero *Aedes*. Durante o início do projeto, os RNAs extraídos de todas as amostras de 2015 foram submetidos a uma reação de RT-PCR, utilizando o protocolo de RT-PCR *Duplex*, para detectar os gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* seguida de uma PCR *Multiplex Nested*, que foi utilizada para a identificação de espécies virais para cada gênero. Ambas as reações seguiram o protocolo descrito em Bronzoni et al. (2005), modificado após a inclusão do *primer* de CHIKV na *Multiplex Nested* para *Alphavirus*

A transcrição reversa para síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima Super Script III (Invitrogen) com os reagentes descritos no quadro 1 para um volume final de 20 µl e *primers* descritos no quadro 2. As condições da RT-PCR seguiram o seguinte programa: 50 °C durante 60 min e 70 °C por 15 min. Logo em seguida, o cDNA foi submetido a reação de PCR *Duplex* com a enzima Taq Platinum (Invitrogen) e os reagentes descritos no quadro 3 para um volume final de 20 µl, e os *primers* descritos no quadro 2. O programa utilizado para a reação foi de 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 53 °C durante 1 min, e 72° C durante 2 min, seguido por um passo de extensão final a 72° C durante 5 min.

**Quadro 1-** Descrição dos reagentes utilizados na reação de RT-PCR *Duplex* gênero específica.

Reagente	Conc. de uso	Conc. final	Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	-	-	1,4
Tampão	5x	1x	4,0
DTT	1 M	0,75 M	1,5
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	1,6
RNase OUT (Invitrogen)	1 U/µl	0,025 U/ µl	0,5
Super ScriptIII	10 µM	0,25 µM	0,5
FG2	10 µM	0,75 µM	1,5
cM3W	100 µM	5 µM	1,0
RNA	-	-	8
Volume Final			20

Fonte: A autora.

**Quadro 2-** *Primers* utilizados nas reações de RT-PCR e RT-qPCR.

<b>Reação</b>	<b>Primers</b>	<b>Sequência 5' - 3'</b>
RT-PCR Duplex	M2W (+)	YAGAGCDTTTTTCGCAWSTRGCHW
	CM3W (-)	ACATRAANKNGTNGTRTCRAANCCDAYCC
	FG1 (+)	TCAAGGAACCTCCACACATGAGATGTACT
	FG2 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA
	NVEE (+)	ACGGAGGTAGACCCATCCGA
PCR <i>Multiplex Nested - Alphavirus</i>	NEE (+)	CCACGGTACCGTTGCC
	NWEE (+)	GGCGGCAGACCTGCTGGAA
	NAURA (+)	TCAATGCACCTTCGACCA
	NMAY (+)	GGAAGTTGGCCAAGGC
	CHIKNSP1-S (+)	TAGAGCAGGAAATTGATCCC
	NDEN1 (-)	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC
PCR <i>Multiplex Nested - Flavivirus</i>	NDEN2 (-)	GAACCAGTTTGTTRTTTCATAGCTGCC
	NDEN3 (-)	CCCATTGGTTCTCCTCTGTG
	NDEN4 (-)	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC
	Dcon 1	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG
RT-PCR <i>Multiplex - Dengue</i>	TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG
	TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG
	TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC
	TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA
RT-qPCR – ZIKV/CHIKV	Zika1087	CCGCTGCCCAACACAAG
	Zika1163c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
	Zika1108 FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACTCAA
	CHIKV 6856	TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA
	CHIKV 6981	TTG ACG AGA GTT AGG AAC ATA CC
	CHIKV 6919 VIC	AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG

**Fonte:** Bronzoni et al. (2005) e Lanciotti et al. (1992, 2007 e 2008).

**Quadro 3-** Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR *Duplex* gênero específica.

Reagentes	Conc. de uso	Conc. final	Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	-	-	28,3
Tampão	10 x	1x	5,0
MgCl	50 mM	2 mM	2,0
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4,0
Tap Platinum (Invitrogen)	5 U/µl	0,02 U/ µl	0,2
FG1	10 µM	0,3 µM	1,5
M2W	50 µM	1 µM	1,0
cDNA	-	-	8,0
Volume Final			50,0

**Fonte:** A autora.

A PCR *Multiplex Nested* para *Flavivirus* e *Alphavirus* foram realizadas com a enzima Taq Platinum (Invitrogen), e os reagentes descritos no quadro 4 para *Flavivirus* e quadro 5 para *Alphavirus*, ambas para um volume final de 50 µl. Os *primers* das duas reações estão descritos no quadro 2 e o programa para amplificação dos fragmentos foi de 25 ciclos de 94 °C durante 1 min, 53 °C durante 1 min, e 72 °C durante 2 min, seguido por um passo de extensão final a 72 °C durante 5 min.

As reações foram realizadas com um controle negativo da reação (todos os reagentes exceto o RNA, cDNA ou produto de PCR), controle negativo da extração (derivado da extração de RNA a partir de água ultrapura) e controle positivo para cada gênero de vírus. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador de luz UV.

**Quadro 4-** Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR *Multiplex* espécie específica para vírus do gênero *Flavivirus*.

Reagentes	Conc. de uso	Conc. final	Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	-	-	28,3
Tampão	10 x	1x	5,0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	2,0
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4,0
Tap Platinum (Invitrogen)	5 U/µl	0,02 U/ µl	0,2
FG1	10 µM	0,3 µM	1,5
n DEN1	10 µM	0,3 µM	1,5
n DEN2	10 µM	0,3 µM	1,5
n DEN3	10 µM	0,3 µM	1,5
n DEN4	10 µM	0,3 µM	1,5
Produto de PCR	-	-	3,0
Volume Final			50,0

Fonte: A autora.

**Quadro 5-** Descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR *Multiplex* espécie específica para vírus do gênero *Alphavirus*.

Reagentes	Conc. de uso	Conc. final	Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	-	-	28,3
Tampão	10x	1x	5,0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	2,0
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4,0
Tap Platinum (Invitrogen)	5 U/µl	0,02 U/ µl	0,2
cM3W	100 µM	2 µM	1,0
nMAY	50 µM	1 µM	1,0
nVEE	50 µM	1 µM	1,0
nEEE	50 µM	1 µM	1,0
nWEE	50 µM	1 µM	1,0
nAURA	50 µM	1 µM	1,0
nCHIK ns-p1	50 µM	1 µM	1,0
Produto de PCR	-	-	3,0
Volume Final			50,0

Fonte: A autora.

No ano de 2016, foi possível otimizar o protocolo de detecção molecular para que fosse utilizada a RT-qPCR com detecção simultânea de ZIKV e CHIKV, o que gerou um aumento da sensibilidade no diagnóstico desses vírus. As amostras recebidas a partir de janeiro de 2016 foram então submetidas a duas reações de RT-PCR diferentes: RT-PCR *Multiplex* convencional para diagnóstico de DENV e uma RT-qPCR *Duplex* para diagnóstico de ZIKV e CHIKV.

A primeira foi uma RT-PCR *Multiplex*, capaz de detectar os quatro sorotipos de DENV, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992), com modificações. A reação era feita em apenas uma etapa com a utilização da enzima RT-AMV (Invitrogen) e PCR Master Mix 2X (Promega), e os reagentes descritos no quadro 6 para um volume final de 25 µl. Os *primers* dessa reação estão descritos no quadro 2 e o mix foi submetido à ciclagem de 50 °C por 30 min, 95 °C por 15 min, 50 °C por 15 seg e 72 °C por 30 seg seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 15 seg, 50 °C por 15 seg, 72 °C por 30 seg, 72 °C por 10 min e pausa em 4 °C. Todas as reações foram realizadas com um controle negativo da reação (todos os reagentes exceto o RNA), controle negativo da extração (derivado da extração de RNA a partir de água ultrapura) e controle positivo de DENV. A separação dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador de luz U.V.

**Quadro 6-** Descrição dos reagentes utilizados na reação de RT-PCR para Dengue.

Reagentes	Conc. de uso	Conc. final	Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	-	-	1,18
PCR Master mix (Promega)	2 x	1x	12,5
DTT	1 M	0,01M	0,25
RT-AMV (Invitrogen)	15 U/µl	0,042 U/ µl	0,07
RNase OUT (Invitrogen)	1 U/µl	0,16 U/ µl	4
Dcon1	10 µM	0,4 µM	1
TS1	10 µM	0,4 µM	1
TS2	10 µM	0,4 µM	1
TS3	10 µM	0,4 µM	1
TS4	10 µM	0,4 µM	1
RNA	-	-	2,0
Volume Final			25

**Fonte:** A autora.

Além da RT-PCR convencional para DENV, as amostras passaram por uma *Duplex* RT-qPCR para detecção de ZIKV e CHIKV de acordo com os protocolos descritos em Lanciotti et al. (2008) e Lanciotti et al. (2007), com modificações. Na RT-qPCR o kit utilizado foi o QuantiNova Probe RT-PCR kit (QIAGEN). Os reagentes desta reação estão descritos no quadro 7, o volume final foi de 15µl. Os *primers* e sondas estão descritos no quadro 2, e a reação ocorreu sob as seguintes condições: 45°C por 15 min, 95°C por 5 min, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 5 seg e 60°C por 45 segundo utilizando o equipamento QuantStudio5 (Applied Biosystems).

Todas as amostras foram testadas em duplicatas, com controle negativo da reação (todos os reagentes exceto o RNA), controle negativo da extração (derivado da extração de RNA a partir de água ultrapura) e positivos (curva de diluição) para cada vírus. Os resultados foram analisados no QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.5. e as amostras com valores de *Ct* (*Cycle threshold*)  $\leq 38,5$  nas duplicatas foram consideradas positivas.

**Quadro 7-** Descrição dos reagentes utilizados na reação de RT-qPCR para Zika e Chikungunya.

Reagente	Conc. de uso	Conc. final	Volume ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	-	-	1,55
QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix	2x	1x	7,5
ZIKV1163c	100 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,12
ZIKV1087	100 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,12
Sonda FAM ZIKV	25 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,12
CHIKV 6856	100 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,12
CHIKV 6981	100 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,12
Sonda VIC CHIKV	25 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,12
QuantiNova ROX™	200 x	1,06x	0,08
QuantiNova RT Mix	100 x	1x	0,15
RNA	-	-	5
Volume Final			15

Fonte: A autora.

## 7.8 Extração de DNA e Detecção de DNA Mitocondrial

Com o objetivo de detectar sangue humano nas amostras, decorrente de uma alimentação recente dos mosquitos, as amostras positivas para presença de vírus foram submetidas a um protocolo de identificação de fonte alimentar para investigar a presença de sangue nas amostras. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo de precipitação por álcool descrito por Ayres et al. (2003), a partir de 30  $\mu$ l do homogenato inicial dos *pools* classificados como não alimentados. Para a confirmação do estado alimentar das fêmeas constituintes desses *pools* foi realizada a PCR descrita em Kocher et al. (1989), assim foi possível avaliar a presença ou ausência de sangue animal, uma vez que os *primers* utilizados amplificam um gene presente em uma região conservada do citocromo b em mais de 100 espécies de animais, incluindo mamíferos, aves, anfíbios, peixes e alguns invertebrados. Todas as reações foram realizadas com um controle positivo de sangue humano e um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA). A separação dos fragmentos amplificados foi realizada em

gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador de luz U.V.

### 7.9 Cálculo da Taxa de Infecção Mínima (MIR)

Para determinar as taxas de infecção viral nas amostras de mosquitos coletadas foi usado o cálculo de taxa de infecção mínima (MIR - *Minimum Infection Rate*). Esse índice é calculado dividindo-se o número de *pools* infectados (positivos) pelo número total de mosquitos testados, multiplicado por 1.000 (CHOW et al., 1998).

### 7.10 Isolamento Viral

As amostras positivas para os vírus estudados foram inoculadas em células C6/36 (originárias de mosquitos da espécie *A. albopictus*). Em placas de 24 poços (Costar<sup>®</sup>, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) foi adicionado 1 ml de suspensão celular contendo  $5 \times 10^5$  células/ml e meio de cultura Leibovitz (L-15), suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1% de antifúngico (Fungizon) e antibióticos (Penicilina/Streptomicina) para a formação da monocamada de C6/36. Após 24 horas, o meio de cultura (L-15) foi descartado e 500 µl da seguinte mistura foram adicionados aos poços. A mistura compreendeu 20 µl do homogenato do *pool* de mosquitos positivo por RT-PCR com 480 µl de meio de cultura, filtrado com filtro de seringa (0,22 µm). Após 1 hora de incubação, para adsorção dos vírus, foi adicionado 1 ml de L-15 suplementado com 2% de soro fetal bovino. Diariamente, durante 4-10 dias pós-infecção (dpi) as placas foram observadas para visualização de efeito citopático (EC) em microscópio invertido (Leica Microsystems, Alemanha).

Após o período de 4-10 dias ou de visualização do EC as células foram congeladas a -80°C, descongeladas e centrifugadas durante 5 min a 2.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para criotubos de 1,8 ml e estocados a -80°C para posterior uso. A partir da segunda passagem as monocamadas de células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (TPP<sup>®</sup> Techno Plastic Products, Suíça) e essas passagens foram feitas com controle negativo e positivo do vírus investigado. Durante o processo, todas as passagens também foram submetidas novamente a detecção molecular já descrita na seção 6.5 deste documento e, as amostras que não apresentaram EC ou aumento de título viral na RT-qPCR foram inoculadas em novas passagens de células até a visualização do EC ou amplificação por RT-qPCR.

### 7.11 Imunofluorescência Indireta

Durante o isolamento viral descrito no tópico 7.9, as amostras que apresentaram EC ou carga viral aumentada na RT-qPCR foram submetidas a um ensaio de imunofluorescência indireta. No 4º dpi (para o vírus CHIKV) e 6º dpi (para DENV e ZIKV) as células foram removidas das garrafas com o auxílio de *cells scrapers* e homogeneizadas, então uma alíquota de 10 µl foi aplicada em uma lâmina específica para imunofluorescência. Após a secagem total da amostra na lâmina, a mesma foi fixada com acetona pura durante 30 min a 20 °C. Foi então adicionado o anticorpo primário (quadro 8) e incubada por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. A lâmina foi então lavada em PBS 1X (dois mergulhos) e em água destilada (dois mergulhos). Após a secagem total foi adicionado o anticorpo secundário (quadro 8) que também foi incubado por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. Após a secagem total, as lâminas foram montadas com o meio de montagem VECTASHIELD® com DAPI (Vector Laboratories, Califórnia) e lamínula. As lâminas foram visualizadas no microscópio de Fluorescência (Leica Microsystems, Alemanha) utilizando o filtro verde em (FITC) para marcação dos vírus e o filtro azul (DAPI) para marcação dos núcleos das células. As imagens foram capturadas pelo software do microscópio na objetiva de 40x.

**Quadro 8-** Descrição dos anticorpos utilizados no ensaio de Imunofluorescência.

Vírus	Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário
DENV2	Anti-DENV2	1:1	Anti-mouse
DENV4	Anti-DENV4	1:1	Anti-mouse
ZIKV	Anti-4G2	1:1	Anti-mouse
CHIKV	Anti-CHIKV	1:50	Anti-mouse

Fonte: A autora.

### 7.12 Sequenciamento

Com o objetivo de avaliar a origem das cepas virais de ZIKV detectadas nos mosquitos, as amostras que apresentaram título viral satisfatório na amplificação inicial (menores valores de *Ct* que variaram de 13 até 34,4) foram submetidas a reações de sequenciamento de nova geração. Foram utilizados inicialmente 7 µl de RNA para a síntese de cDNA utilizando 1 µl de *primer* randômico hexâmero (Invitrogen), seguido por uma incubação a 65° C por 5 min. Em seguida foram adicionados à reação 10 µl do mix de reação e 2 µl do mix de enzima do kit

*ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis* (New England BioLabs) e finalmente submetidos a seguinte condição: 25° C por 5 min, 48° C por 15 min, 80° C por 5 min.

Para a preparação da biblioteca foi utilizado o kit *Nextera XT Library Prep Kit* (Illumina) seguindo as instruções do fabricante. Para isto, foram utilizados *pools* de *primers* descritos pelo projeto ZIBRA (FARIA et al., 2016). Após a amplificação, os produtos de PCR foram quantificados usando um kit *Qubit dsDNA HS* (Invitrogen, Life Technologies). Para o sequenciamento, foi utilizado o kit MiSeq Reagent V3 de 150 ciclos.

Adicionalmente, um segundo protocolo de sequenciamento de nova geração foi otimizado ao longo desse projeto. A metodologia de sequenciamento de ZIKV por enriquecimento com sonda de biotina também foi realizado com a amostra com o menor valor de *Ct* (1A/2015HA). O protocolo foi desenvolvido pela Illumina seguindo as diretrizes do fornecedor usando o kit TruSeq® RNA Access. Inicialmente foi realizada a quantificação do RNA usando o kit *Qubit RNA HS* (Invitrogen, Life Technologies) e determinado o *input* inicial de 20 ng de RNA. A estratégia de sequenciamento de pares foi realizada com o uso do kit *MiSeq Reagent Kit V3* (150 ciclos) gerando 2 x 75 pb de *reads* separadas por aproximadamente 350 pb. Todo o processo de sequenciamento foi realizado no MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) disponível no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM.

### 7.13 Análise Filogenética

A qualidade dos *reads* foi avaliada com o software FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e as sequências de baixa qualidade foram filtradas com Trimmomatic v 0.36. O genoma de referência utilizado foi o PE243 (KX197192.1) para mapear as sequências obtidas usando o Bowtie2. As sequências foram alinhadas usando o MAFFT e editadas manualmente usando o AliView. Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança foram geradas pelo Phyml v3.0.(GUINDON et al., 2010) usando a substituição de nucleotídeos GTR + I + G, escolhida como o modelo mais adequado (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017). A robustez estatística da topologia da árvore foi inspecionada usando a LRT (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006).

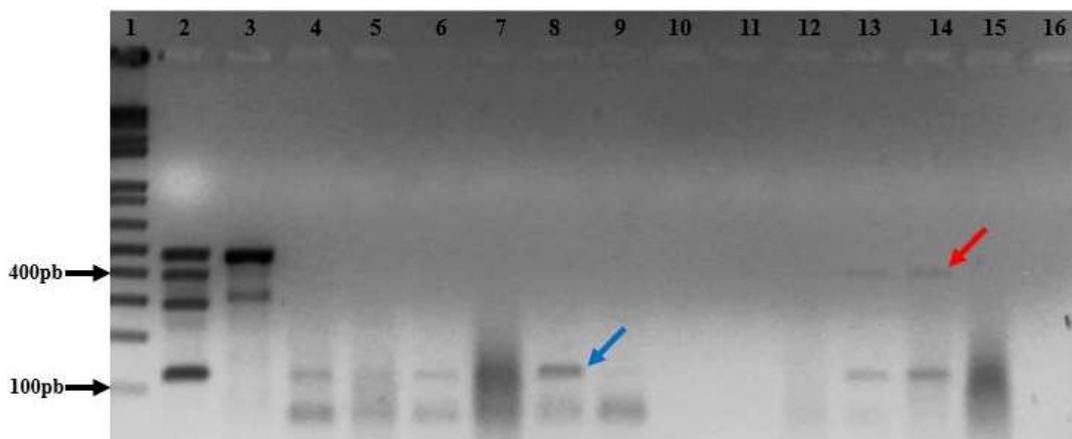
## **8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo envolveu coletas, realizadas pela equipe de campo do IAM, em residências de pessoas acometidas por arboviroses, sendo assim foi necessário o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O comitê avaliou e disponibilizou a anuência (em anexo) com o N° do Registro do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 51012015.9.0000.5190 e N° do Parecer PlatBr 1.547.598 (Anexo A). A pesquisa não envolveu o uso de animais de laboratório, sendo assim, não se fez necessária a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

## 9 RESULTADOS

No período de 2015 a 2017 foram realizadas 256 coletas em endereços de residências, locais públicos, hospitais e UPAS (detalhamento no apêndice A). No total, foram coletadas 6.227 fêmeas (1.049 *pools*), das quais 3.223 foram da espécie *A. aegypti* (51,75%) distribuídas em 497 *pools*, duas de *A. albopictus* (0,03%) acondicionadas em 1 *pool*, uma de *A. taeniorhynchus* (0,01%) acondicionada em 1 *pool*, 11 de *A. scapularis* (0,17%) acondicionadas em 1 *pool*, e 2.990 fêmeas de *C. quinquefasciatus* (48,02%) distribuídas em 549 *pools*. Os machos obtidos no presente trabalho foram armazenados -80° C, para eventual utilização em outro projeto científico. Após as reações de RT-PCR e RT-qPCR, foram identificados 219 *pools* positivos para arbovírus, sendo 69 deles constituídos de fêmeas não ingurgitadas, com confirmação da ausência de sangue por PCR. Deste total, 19 *pools* foram positivos para DENV, sendo 17 para DENV2, e dois para DENV4 (Figura 15), 194 foram positivos para ZIKV e seis para CHIKV (Figura 16). Dentre as amostras positivas, nove *pools* apresentaram infecção simultânea para DENV2 e ZIKV, sendo cinco *pools* de *A. aegypti* e quatro de *C. quinquefasciatus*. Além desses, um *pool* de *C. quinquefasciatus* apresentou infecção simultânea para DENV2 e DENV4. Estes resultados estão detalhados no quadro 9.

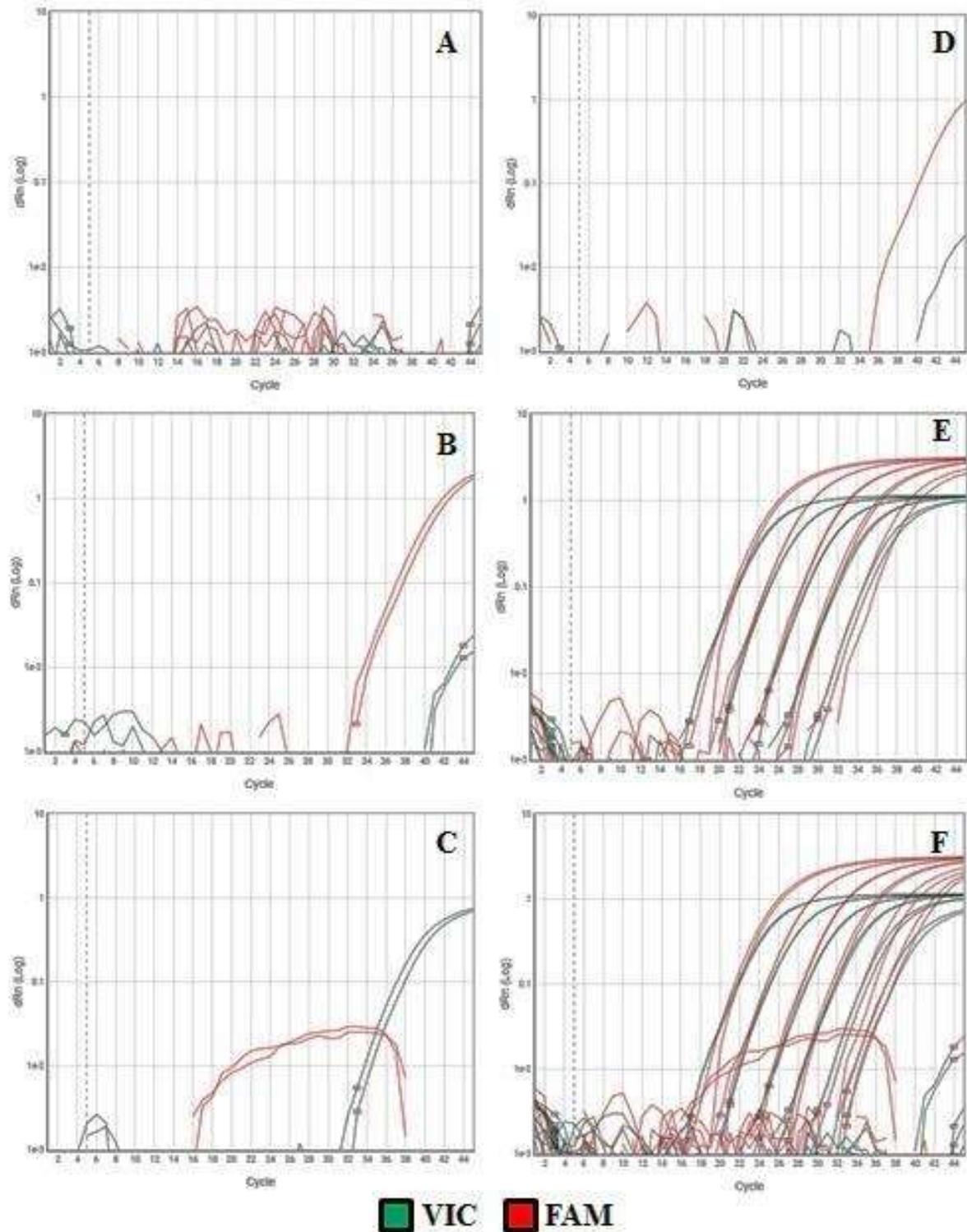
**Figura 15-** Gel de agarose 1,5% representativo do padrão de bandas do vírus Dengue na RT-PCR.



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** **1:** Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA *ladder* (Invitrogen), **2:** Controles dos quatro sorotipos de DENV, **3:** Controle positivo da reação (DENV1), **4 ao 15:** Resultado das amostras de mosquitos da RMR (2015, 2016 e 2017), **13 e 14:** Amostras com dupla infecção (DENV2 e DENV4), **16:** Controle negativo, **seta vermelha:** padrão de banda positiva para DENV4, **seta azul:** padrão de banda positiva para DENV2.

**Figura 16-** Gráfico da curva de amplificação de Zika e Chikungunya na RT-PCR em tempo real.



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** A- Controles negativos (não amplificação); B- Amostra 1349/2017HA (amplificação para ZIKV); C- Amostra 1318/2017HA (amplificação para CHIKV); D- Amostra 1326/2017HA (amplificação inespecífica); E- Controles positivos (amplificação das curvas de diluições de CHIKV e ZIKV); F- Junção das amplificações visualizadas em A, B, C, D e E; VIC- Amplificação referente a CHIKV e FAM- Amplificação referente a ZIKV.

Em relação aos valores da Taxa de Infecção Mínima (MIR), houve variação de 18,59 até 1000 para ZIKV durante os anos avaliados, para DENV a MIR variou de 0,68 a 13,77 e para CHIKV a MIR encontrada foi de 2,75 em *A. aegypti*. Todos os valores de MIR estão detalhados no quadro 9 de acordo com o vírus encontrado por espécie.

**Quadro 9-** Descrição das amostras positivas e valores de MIR para cada espécie.

<b>Espécies</b>	<b>Ano</b>	<b>Pools +</b>	<b>Pools + Ingurgitados</b>	<b>DENV +</b>	<b>MIR</b>	<b>ZIKV +</b>	<b>MIR</b>	<b>CHIKV +</b>	<b>MIR</b>
<i>A. aegypti</i>	2015	42*	33	10	13,77	30	41,32	2	2,75
	2016	42*	36	2	1,91	39	37,32	-	-
	2017	32	31	1	0,68	27	18,59	4	2,75
<i>A. taeniorhynchus</i>	2015	1	0	-	-	1	1.000**	-	-
	2016	-	-	-	-	-	-	-	-
	2017	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. quinquefasciatus</i>	2015	-	-	-	-	-	-	-	-
	2016	75*	38	6	2,55	70	29,86	-	-
	2017	27	12	-	-	27	51,42	-	-
<b>Total</b>		<b>219*</b>	<b>150</b>	<b>19</b>		<b>194</b>		<b>6</b>	

**Fonte:** A autora.

**Nota:** \*Total de pools positivos com as duplas infecções contabilizadas e \*\* Taxa de infecção referente a um indivíduo analisado.

A inoculação das amostras positivas em células C6/36 foi realizada com 32 amostras que apresentaram amplificação por RT-PCR ou tiveram os valores de *Ct* mais baixos na RT-qPCR. Dessas amostras selecionadas, 19 foram positivas por RT-PCR para DENV, incluindo as nove que apresentaram dupla infecção, sete amostras foram positivas para ZIKV e todas as seis positivas para CHIKV. Dentre essas amostras, apenas três (13DE/2015RA, 17F/2015HA e 18/2015HA) apresentaram EC característico de DENV2 (Figura 17), com o aumento de carga viral confirmado por RT-qPCR. Em relação ao ZIKV, apenas uma amostra (1A/2015HA) apresentou EC e aumento de carga viral por RT-qPCR. A imunofluorescência foi realizada a com três dessas quatro amostras isoladas (Figura 18).

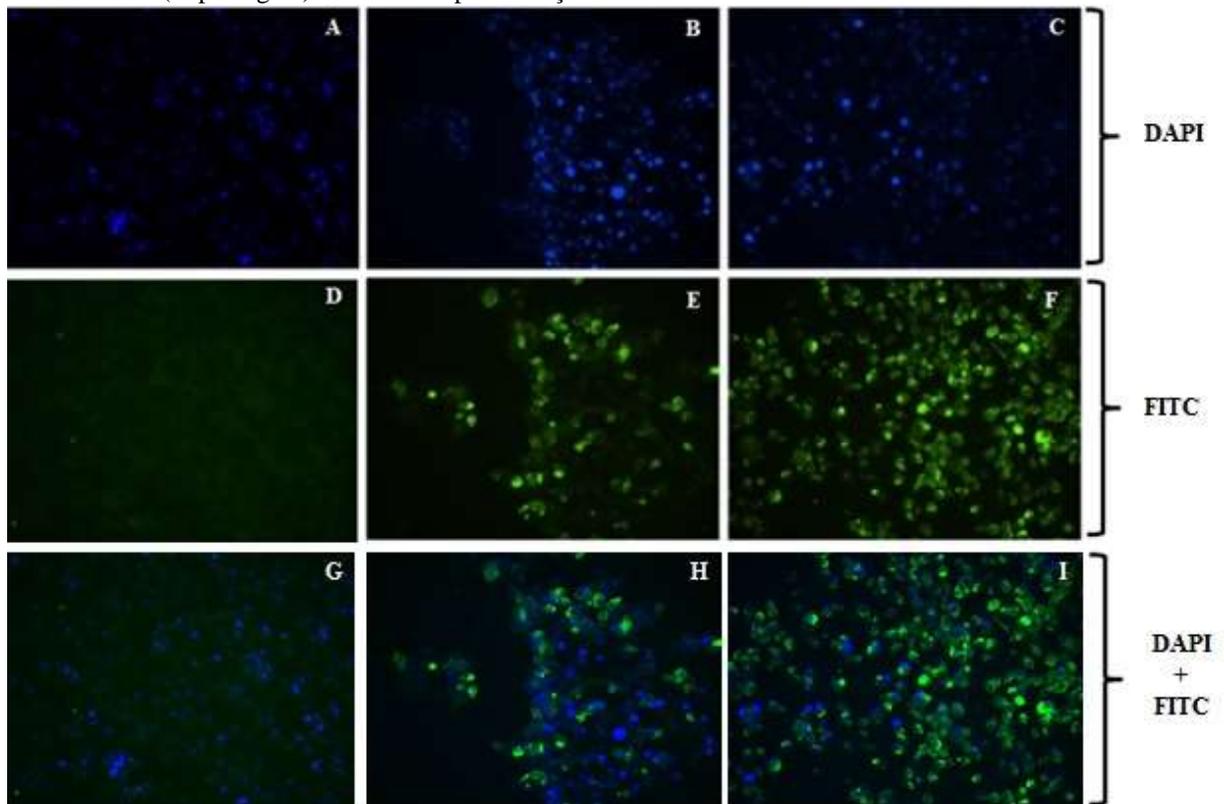
**Figura 17-** Painel de fotos da 3ª passagem de células C6/36 com DENV isolados de mosquitos no quarto dia pós-infecção.



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** Fotos capturadas com a lente objetiva de 20x de aumento. **A-** Células C6/36 negativas; **B-** Células C6/36 inoculadas com a amostra 18/2015HA e **C-** Células C6/36 inoculadas com o controle positivo de DENV2.

**Figura 18-** Painel de fotos do ensaio de imunofluorescência para ZIKV isolado de *Aedes aegypti* em células C6/36 (2ª passagem) no sexto dia pós-infecção.



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** Fotos capturadas com aumento de 400x. **A, D e G-** Imunofluorescência de células C6/36 negativas; **B, E e H-** Imunofluorescência de células C6/36 inoculadas com a amostra 1A/2015HA e **C, F e I-** Imunofluorescência de células C6/36 inoculadas com o controle positivo de ZIKV.

Após o processamento por RT-qPCR, as amostras positivas para ZIKV que apresentaram os menores valores de *Ct* (variaram de 13 até 34,4) foram selecionadas para sequenciamento de nova geração. Sendo assim, foram sequenciadas sete amostras: 1A/2015HA (coletada no Hospital Getúlio Vargas em 26/05/2015), 962/2016RC (coletada em uma residência do bairro de Campo Grande em 28/06/2016), 921/2016LPA (coletada no Espaço Ciência em 13/06/16) , 959/2016RA (coletada em uma residência do bairro de Campo Grande em 28/06/2016), 916/2016RC (coletada no Espaço Ciência em 13/06/16), 961/2016RC (coletada em uma residência do bairro de Campo Grande em 28/06/2016) e 1001/2016RC (coletada em uma residência do bairro de Brasília Teimosa em 06/07/2016) com a metodologia de *amplicons* e a amostra 1A/2015HA foi também processada com a metodologia de sequenciamento com o uso de sondas. A amplitude de cobertura genômica das oito sequências estão representadas na figura 19 e detalhadas no quadro 10.

A construção da árvore filogenética foi realizada com genomas completos ou parciais de ZIKV obtidos no presente estudo e outros obtidos em banco de dados de sequências (Figura 20). Os genomas de ZIKV obtidos neste estudo estão agrupados em dois clados bem suportados (valores de aLRT de 0,90 no clado I e 0,93 no clado II) dentro do clado referente a epidemia americana de ZIKV (quadrados tracejados na Figura 20). Em uma análise mais detalhada, foi observado que os dois genomas obtidos do mesmo *pool* de *A. aegypti* (amostra 1A/2015HA) amostrado em maio de 2015, foi agrupado com outros dois genomas de ZIKV do Rio de Janeiro (KY785455 e KU785480) coletados em abril e março de 2016. Além disso, os seis genomas restantes agruparam-se com genomas do ZIKV da Paraíba (KX280026) e Ceará (KX811222) (Figura 21).

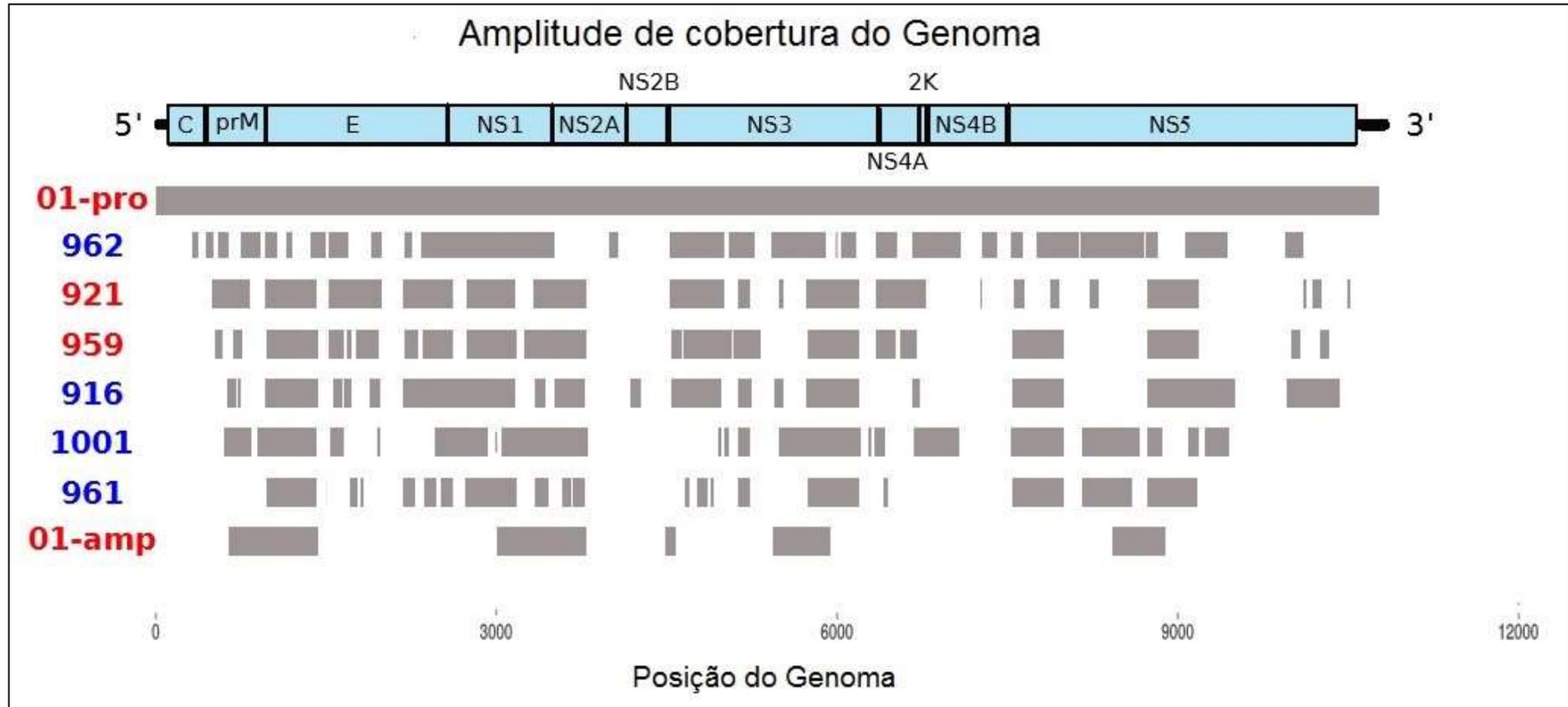
**Quadro 10-** Descrição das sequências do vírus Zika obtidas após Sequenciamento de Nova Geração a partir de amostras de mosquitos.

<b>ID</b>	<b>Nº ♀ (espécie)/Pool</b>	<b>Fêmeas Ingurgitadas</b>	<b>Ct</b>	<b>Método</b>	<b>Reads (Milhões)</b>	<b>Reads mapeados</b>	<b>Largura da cobertura</b>	<b>Profundidade da cobertura</b>
1A	9 <i>A. aegypti</i>	Sim	13	Sonda	7.3	6.7 Milhões	100%	46.854
962	5 <i>C. quinquefasciatus</i>	Não	34,4	<i>Amplicon</i>	1.1	61.908	60%	430
921	1 <i>A. aegypti</i>	Sim	34,1	<i>Amplicon</i>	1	36.848	52%	256
959	1 <i>A. aegypti</i>	Sim	34	<i>Amplicon</i>	0.6	52.079	50%	361
916	3 <i>C. quinquefasciatus</i>	Não	34	<i>Amplicon</i>	2.2	63.601	48%	441
1001	4 <i>C. quinquefasciatus</i>	Sim	33,15	<i>Amplicon</i>	0.7	144.061	46%	1.000
961	9 <i>C. quinquefasciatus</i>	Sim	33	<i>Amplicon</i>	1.0	41.680	39%	289
1A	9 <i>A. aegypti</i>	Sim	13	<i>Amplicon</i>	0.6	83.057	24%	597

**Fonte:** A autora.

**Legenda:** **1A-** Amostra 1A/2015HA; **962-** Amostra 962/2016RC; **921-** Amostra 921/2016LPA; **959-** Amostra 959/2016RA; **916-** Amostra 916/2016RC; **1001-** Amostra 1001/2016RC e **961-** Amostra 961/2016RC.

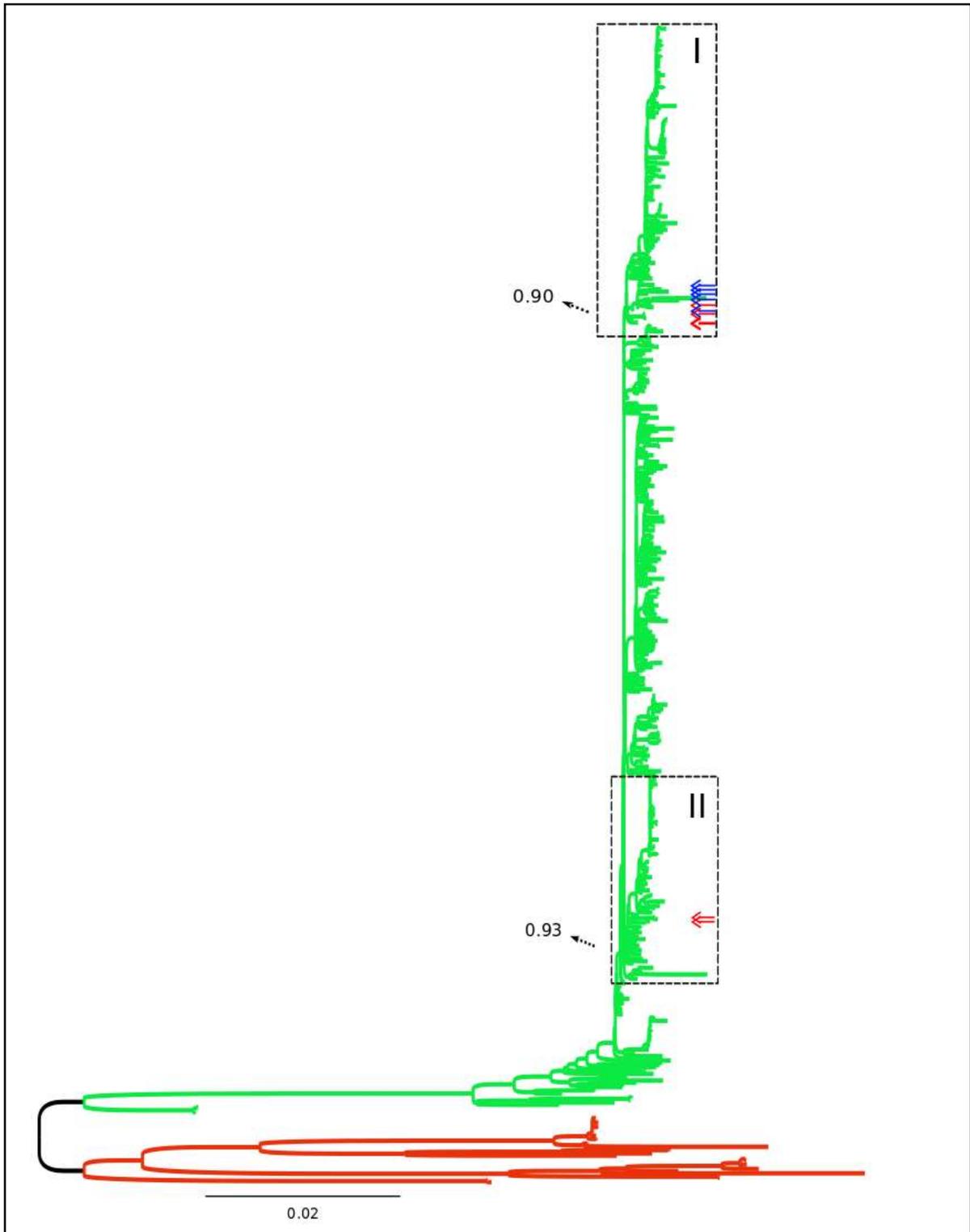
**Figura 19-** A amplitude de cobertura genômica das sequências de Zika.



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** Números em vermelho - Amostras de *A. aegypti* e Números em azul - Amostras de *C. quinquefasciatus*.

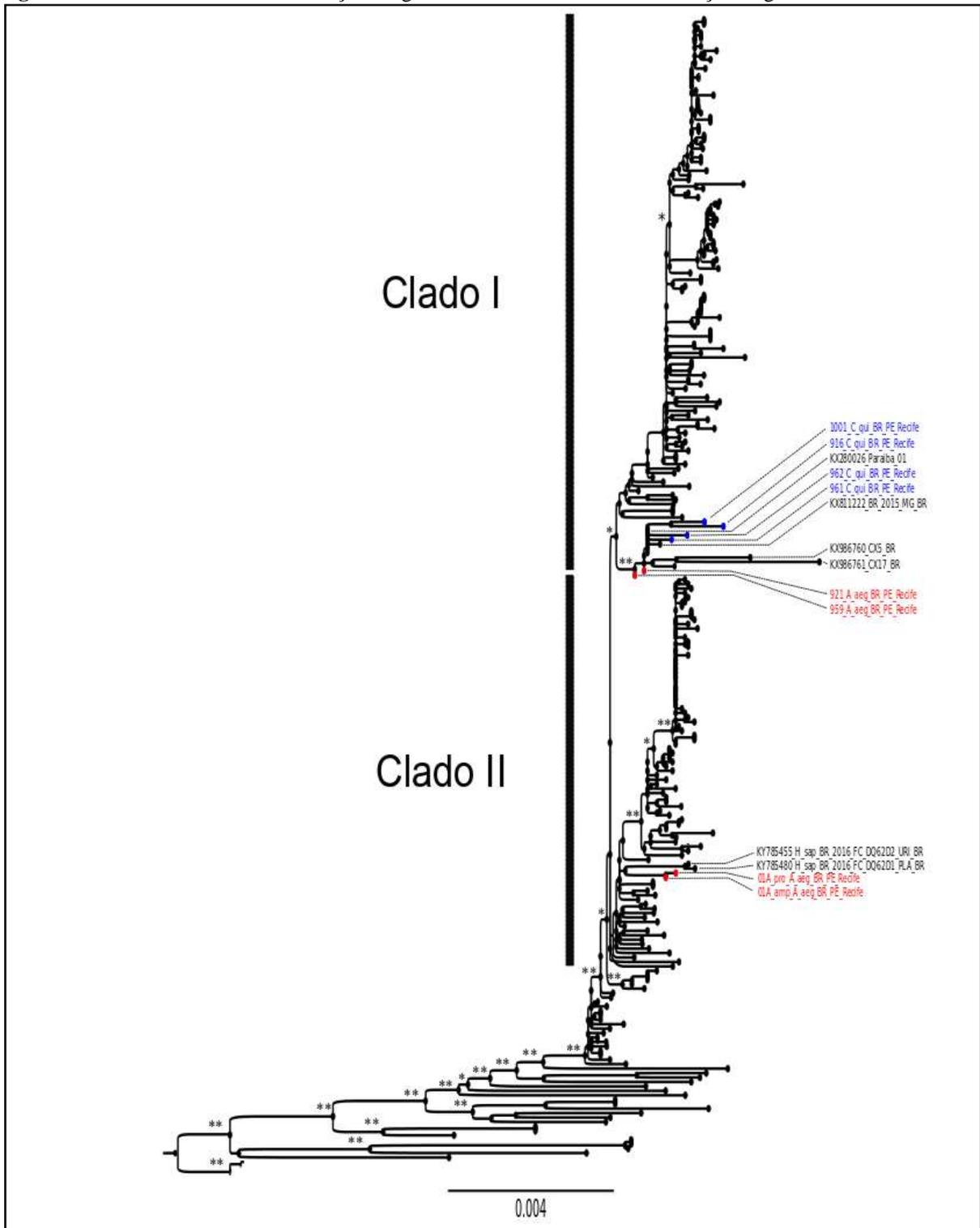
**Figura 20-** Visão ampla da relação filogenética entre os genomas de Zika.



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** Ramos vermelhos – Genótipos africanos de ZIKV; Ramos verdes – Genótipos asiáticos de ZIKV; Setas vermelhas- Posicionamento dos quatro genomas obtidos neste estudo na espécie *A. aegypti*; Setas azuis- Posicionamento dos quatro genomas obtidos neste estudo na espécie *C. quinquefasciatus*; Quadrados tracejados - clados I e II onde os 8 genomas se agrupam.

**Figura 21-** Visão detalhada da construção filogenética de máxima verossimilhança dos genomas de Zika.

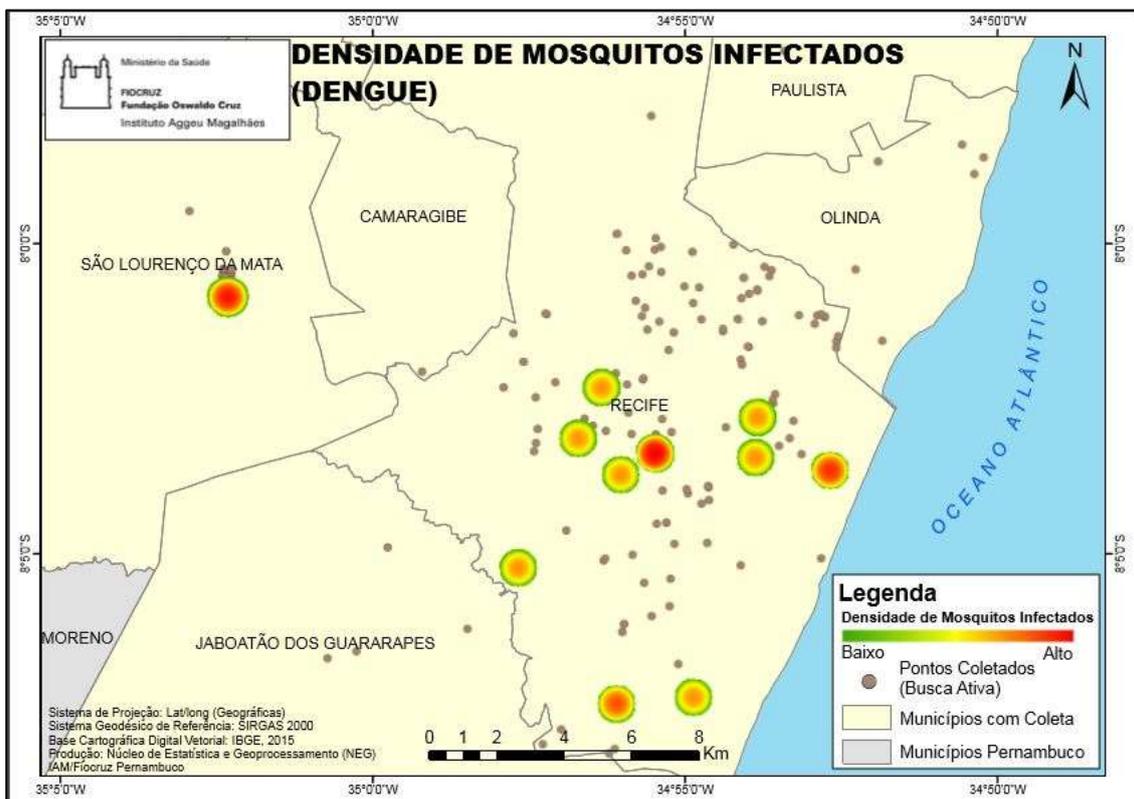


**Fonte:** A autora.

**Legenda:** Genomas em vermelho - Posicionamento dos quatro genomas obtidos neste estudo na espécie *A. aegypti*; Genomas em azul - Posicionamento dos quatro genomas obtidos neste estudo na espécie *C. quinquefasciatus*; Asteriscos duplos - suporte de ramificação aLRT  $\geq 90$ ; Asteriscos simples - suporte de ramificação aLRT  $\geq 80$ .

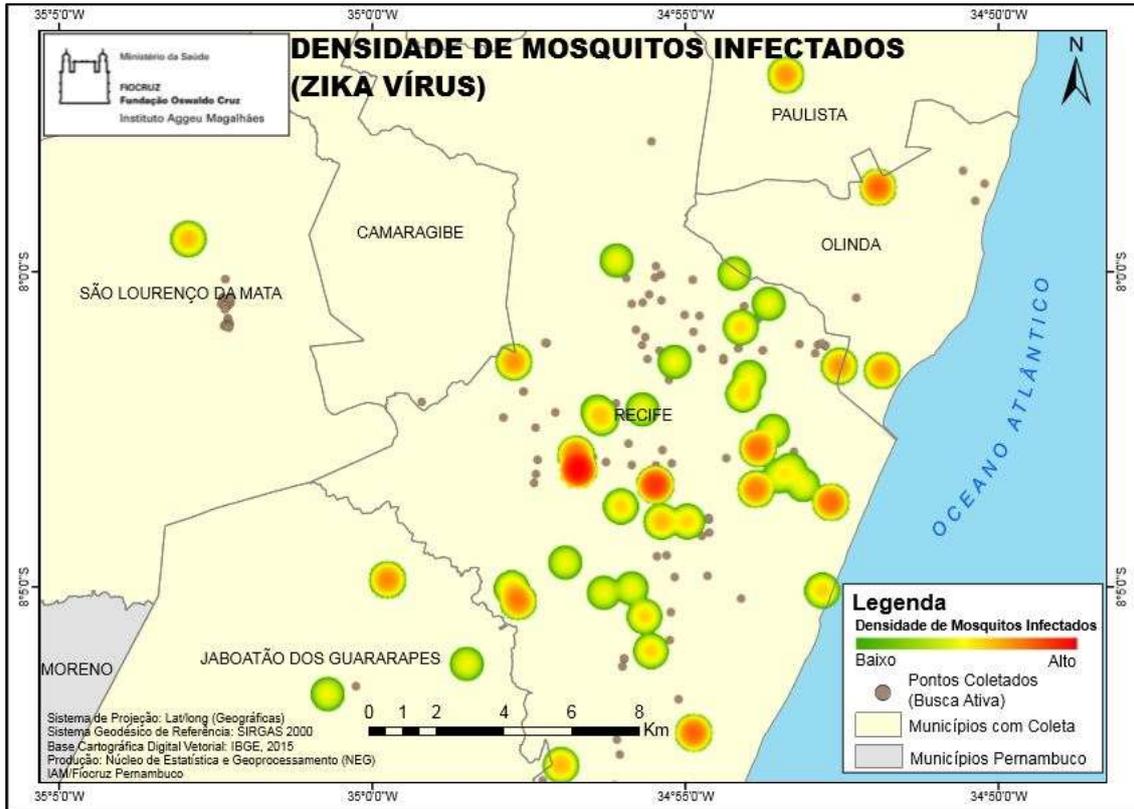
A partir da identificação de amostras positivas foi possível apresentar em mapas esquemáticos do tipo Kernel a distribuição dessas amostras para visualização da densidade de mosquitos infectados na RMR. Assim, foram identificados os pontos quentes que corresponderam aos locais com maior circulação viral para DENV (Figura 22), ZIKV (Figura 23) e CHIKV (Figura 24). Após a análise dos pontos quentes foi observado que as áreas com maior número de mosquitos infectados estavam concentradas no município de Recife. Os bairros que apresentaram os pontos com maior densidade de mosquitos infectados para os três vírus investigados estão descritos no quadro 11 para detalhamento de indicadores como: classe socioeconômica, densidade demográfica e número de domicílios.

**Figura 22-** Mapa de densidade de mosquitos infectados com Dengue.



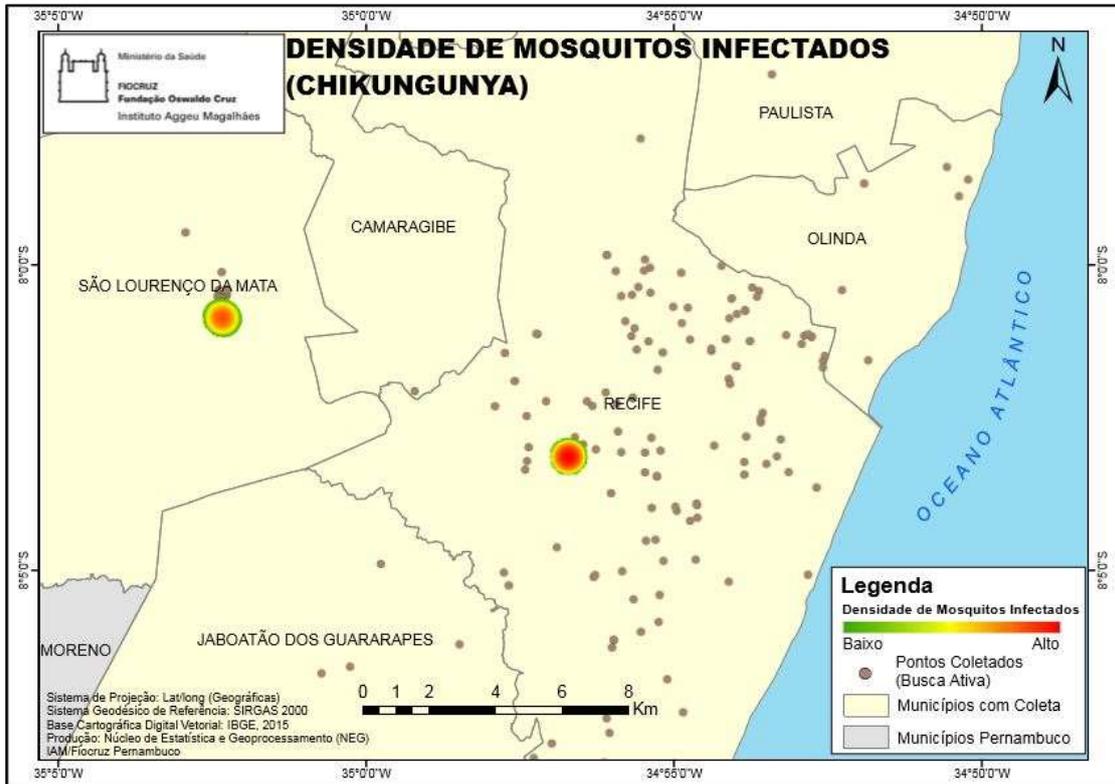
**Fonte:** A autora a partir do ArcGIS.

**Figura 23-** Mapa de densidade de mosquitos infectados com Zika.



**Fonte:** A autora a partir do ArcGIS.

**Figura 24-** Mapa de densidade de mosquitos infectados com Chikungunya.



**Fonte:** A autora a partir do ArcGIS.

**Quadro 11-** Indicadores sociais de bairros do município de Recife com circulação dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya identificados em populações de mosquitos no período de 2015 a 2017.

<b>Vírus</b>	<b>Bairro</b>	<b>Classe Socioeconômica</b>	<b>Densidade demográfica (hab./ha)</b>	<b>Número de Domicílios</b>
DENV	Ibura	Baixa	49,69	15.078
DENV/ZIKV	Cordeiro	Média Baixa	121,02	12.797
DENV/ZIKV	Santo Antônio	Média Baixa	3,53	142
ZIKV/CHIKV	Cidade Universitária	Média Baixa	5,05	222
ZIKV	Graças	Alta	143,08	7.015
ZIKV	Derby	Alta	43,85	656
ZIKV	Boa Vista	Média Alta	84,15	5. 999
ZIKV	Sancho	Média Baixa	177,46	2.374
ZIKV	Tejipió	Média Baixa	94,63	2.682
ZIKV	Imbiribeira	Média Baixa	72,85	14.969

Fonte: IBGE, 2010.

## 10 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a circulação de três arbovírus de importância médica (DENV, ZIKV e CHIKV) em populações de mosquitos. Estes foram coletados em diferentes municípios da RMR durante um período de tríplice epidemia no Brasil. Os nossos achados demonstram que há circulação de DENV em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, CHIKV em *A. aegypti* e ZIKV em *A. aegypti*, *A. taeniorhynchus* e *C. quinquefasciatus*. Assim, este trabalho foi pioneiro na identificação de ZIKV em amostras de *C. quinquefasciatus* de campo (GUEDES et al., 2017a). A investigação de arbovírus em amostras de campo de *A. aegypti* já é realizada há muito tempo por diferentes grupos de pesquisa (BARBOSA et al., 2016; GUEDES et al., 2010; MARTINS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2018), uma vez que essa espécie é notadamente reconhecida como vetora de diferentes arbovírus (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; GÖERTZ et al., 2017; GUBLER, 2011; LI et al., 2012; POWELL; TABACHNICK, 2013; VEGA-RUA et al., 2014). Porém, com a introdução de ZIKV em 2014, houve a necessidade de incorporar ao estudo uma maior diversidade de espécies, com o intuito de compreender o papel de cada uma no ciclo de transmissão, uma vez que a identificação dos vetores em áreas endêmicas é essencial para melhor projetar ações eficientes de controle (AYRES, 2016; COSTA-DA-SILVA et al., 2017a).

Em relação aos dados de DENV, a presença de espécimes de *A. aegypti* naturalmente infectados, têm sido reportada em todo o território nacional (BARBOSA et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2013; GUEDES et al., 2010; MEDEIROS et al., 2018; SERRA et al., 2016). Em 2010, um estudo sobre vigilância entomológica realizado no Estado de Pernambuco já demonstrava a co-circulação de três dos quatro sorotipos de DENV (DENV1, DENV2 e DENV3) em populações de *A. aegypti*, antes da notificação do sorotipo 4 em humanos (GUEDES et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados em 2016, após a coleta de *A. aegypti* em diferentes localidades da ilha de Fernando de Noronha para monitoramento de possíveis sorotipos de DENV circulantes. Este trabalho identificou pela primeira vez a circulação de DENV1 naquela localidade (BARBOSA et al., 2016). Esse padrão de co-circulação de diferentes sorotipos de DENV em populações de *A. aegypti* também foi reportado em estudos conduzidos nos estados do Amazonas (AM), Rio Grande do Norte (RN) e Mato Grosso (MT) (FIGUEIREDO et al., 2013; MEDEIROS et al., 2018; SERRA et al., 2016).

A taxa de infecção mínima (MIR) é usada como um importante indicador para estudar a circulação de vírus nas populações de mosquitos. A comparação dos valores de MIR para

DENV em *A. aegypti* encontrados no ano de 2015 na RMR são similares àqueles encontrados no RN (MIR = 16,2) no período de 2011 a 2014, bem como no MT nos anos de 2009 e 2010 (MIR = 15,4) (FIGUEIREDO et al., 2013; MEDEIROS et al., 2018). Esses dados demonstram que ainda há a circulação de todos os sorotipos de DENV em amostras de *A. aegypti* no Brasil, o que significa que mesmo que haja uma diminuição no número de casos notificados da doença, o vírus continua presente na população de mosquitos e o risco de uma nova epidemia pode ser iminente.

Além da infecção de *A. aegypti* por DENV, nosso trabalho também identificou a presença deste vírus em amostras de *C. quinquefasciatus*. A identificação de mosquitos do gênero *Culex* provenientes de campo positivas para DENV pode ser resultado da presença de sangue infectado de um indivíduo virêmico nas fêmeas ingurgitadas após o repasto sanguíneo (SERRA et al., 2016). Este fenômeno já foi descrito em estudos anteriores com mosquitos provenientes da China (LUO, 1993) e Brasil (Mato Grosso) (SERRA et al., 2016). O isolamento de DENV a partir de amostras de *C. quinquefasciatus* de campo não é comumente realizado pelos estudos de vigilância, uma vez que estudos de competência vetorial demonstram que esta espécie é considerada refratária ao DENV (VAZEILLE-FALCOZ et al., 1999). Porém, no estudo de Serra e colaboradores (2016), foi isolado DENV4 em células C6/36 a partir de *pools* contendo fêmeas não alimentadas de *C. quinquefasciatus*. Embora os estudos sobre competência vetorial mostrem que o vírus DENV não é capaz de ser transmitido por mosquitos do gênero *Culex* (VAZEILLE-FALCOZ et al., 1999), ou ainda que comparado com *A. aegypti* é menor eficiente (LUO, 1993).

As características como alta densidade populacional e alto grau de antropofilia dos mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus* podem expandir a possibilidade da coleta de espécimes que contenham sangue oriundo do repasto sanguíneo em seu organismo. O que pode aumentar a probabilidade de identificação da presença de arbovírus circulantes na população hospedeira. Desta forma, essas evidências demonstram que mosquitos do gênero *Culex* podem ser úteis em estudos de monitoramento (BRINKMANN; NITSCHKE; KOHL, 2016; DIALLO et al., 2018; SHI et al., 2015).

Além de DENV, CHIKV também foi detectado em amostras de *A. aegypti* coletadas na RMR. Na América do Sul, durante o monitoramento realizado no Equador na epidemia de 2015 foi detectada a circulação de CHIKV em *A. aegypti* com valores de MIR semelhantes ao encontrado no presente trabalho (MIR=2,75) (CEVALLOS et al., 2018). Essas taxas de infecção encontradas no ano de 2015 na RMR e no Equador, mesmo que menores do que as

encontradas em outros estudos (ARAGÃO et al., 2018; CIGARROA-TOLEDO et al., 2016; COSTA-DA-SILVA et al., 2017b), podem ser consideradas altas de acordo com o descrito por Gu e colaboradores (2008), que relatou valores das taxas de infecção durante epidemias em locais com intensa circulação viral. Ao contrário do que foi observado no estudo do Equador e na RMR, as taxas de infecção mínima para CHIKV foram inferiores as taxas obtidas em estudos conduzidos em outros estados da região Nordeste com a mesma espécie. Por exemplo, a MIR para CHIKV observada em Sergipe foi de 26,31 (COSTA-DA-SILVA et al., 2017b), enquanto que no Maranhão a MIR foi de 7,00 (ARAGÃO et al., 2018). Em um estudo conduzido no México em 2016, além da detecção de CHIKV com uma MIR de 8,4, o vírus também foi isolado a partir de dois *pools* de mosquitos da espécie *A. aegypti* (CIGARROA-TOLEDO et al., 2016), o que não foi possível no presente estudo. A não detecção de CHIKV em *pools* do ano de 2016 e a impossibilidade do isolamento de CHIKV a partir das amostras positivas dos anos de 2015 e 2017 na RMR pode ter sido devido a diminuição do título viral durante o reprocessamento das amostras. A dificuldade de isolar arbovírus em células C6/36 devido a baixa carga viral já foi reportado em estudos com DENV (JARMAN et al., 2011). O que diverge do isolamento realizado no México que usou amostras recém coletadas (CIGARROA-TOLEDO et al., 2016). Alguns estudos (ANDRIES et al., 2015; HALL-MENDELIN et al., 2017) descrevem os problemas encontrados durante o processamento de amostras virais, uma vez que essas sejam acondicionadas de forma incorreta, descongeladas mais de uma vez ou tenham baixa carga viral.

Com relação ao monitoramento de ZIKV nas espécies coletadas na RMR, foi detectada a presença de ZIKV em mosquitos das espécies *A. aegypti*, *A. taeniorhynchus* e *C. quinquefasciatus*. A detecção de ZIKV em diferentes espécies de mosquitos corrobora com o que foi publicado em uma revisão sistemática sobre a diversidade de espécies de mosquitos que são competentes ou já foram encontradas infectadas naturalmente com ZIKV. No entanto, estes resultados divergem com relação às espécies *A. taeniorhynchus* e *C. quinquefasciatus*, que não foram considerados vetores de ZIKV e não foram reportados como naturalmente infectados (EPELBOIN et al., 2017). A MIR encontrada em *A. taeniorhynchus* foi de 1000, entretanto apenas um indivíduo dessa espécie foi analisado. No Brasil, a circulação de ZIKV em *A. taeniorhynchus* foi reportada no Espírito Santo (AYRES et al., 2019) em um estudo sobre monitoramento de ZIKV em amostras de mosquitos de campo provenientes do estado do Espírito Santo. De acordo com Eastwood e colaboradores (2013), a espécie *A. taeniorhynchus* é um vetor competente para WNV, e na análise de alguns parâmetros de capacidade vetorial,

os autores encontraram um padrão de hematofagia eclético da espécie, porém com preferência alimentar com cerca de 84% para mamíferos (24% de sangue humano). Esse mosquito também pode ser vetor de diferentes encefalites, como a Encefalite Equina Oriental EEEV (ORTIZ; WEAVER, 2004).

No que se refere ao *A. aegypti*, espécie que considerada o principal vetor no Brasil, dois estudos realizados no Rio de Janeiro (RJ) identificaram a presença de *A. aegypti* naturalmente infectados com ZIKV durante a epidemia com MIR de 6,36 (FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016) e 4,92 (AYLLON et al., 2017). Em outros países, como no México, a circulação de ZIKV também foi reportada em 2016 com MIR de 31,77 (GUERBOIS et al., 2016) e em 2018 com MIR de 10,28 (ELIZONDO-QUIROGA et al., 2017). Considerando que os trabalhos citados foram publicados dentro do mesmo período de análise (2015 a 2017), os valores de MIR (18,59 e 41,32) encontrados no presente estudo na RMR foram superiores. Considerando os achados de ZIKV em *C. quinquefasciatus*, são poucos os estudos para efeitos de comparação com os dados descritos aqui, uma vez que a investigação com mosquitos do gênero não é objeto de vigilância entomológica nos programas de controle, e apenas poucos estudos no mundo reportam a circulação do vírus em mosquitos, como Diallo e colaboradores (2014) com *C. perfuscus* e Elizondo-Quiroga e colaboradores (2017) com diferentes espécies do gênero *Culex*. Este último, realizado no México com a coleta no campo de diversas espécies de mosquitos demonstrou a infecção natural por ZIKV com posterior isolamento viral a partir de amostras de glândulas salivares. Neste trabalho foi detectado ZIKV nas espécies *C. quinquefasciatus* (MIR de 34,08), *C. coronator* (MIR de 29,10) e *C. tarsalis* (MIR de 180,82), corroborando com o presente trabalho que detectou ZIKV em *C. quinquefasciatus* com valor de MIR de 29,86 em 2016 e 51,42 em amostras coletadas em 2017.

A detecção da presença do vírus em mosquitos de campo, bem como estudos sobre competência vetorial, densidade populacional e preferência alimentar são critérios utilizados na compreensão detecção da presença do vírus em mosquitos de campo, quando novos arbovírus são introduzidos em uma determinada região (AYRES, 2016; SHAW; CATTERUCCIA, 2018). Quando um surto ou epidemia em área urbana ocorre, as espécies com maior densidade na região devem ser investigadas, de forma a avaliar a situação epidemiológica de cada localidade (AYRES, 2016). Apesar de ZIKV ter sido isolado em 1948 e 1956 apenas em *A. africanus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; WEINBREN; WILLIAMS, 1958), outras espécies de mosquitos que foram coletadas naquela época foram descartadas, de forma que nenhuma outra espécie foi testada para a presença de ZIKV. Após quase seis décadas, casos de Zika foram

relatados na Micronésia em 2007 (DUFFY et al., 2009) e na Polinésia Francesa em 2013 (CAO-LORMEAU et al., 2014), com a implicação de *A. polinesiensis* como vetor primário. Porém, análises *à posteriori* demonstram a baixa competência a ZIKV de *A. polinesiensis* provenientes da Polinésia Francesa. Estes dados sugerem que, apesar de ser a espécie mais abundante naquela localidade, outra espécie poderia ter participado do ciclo de transmissão de ZIKV (CAO-LORMEAU et al., 2014; RICHARD; PAOAAFAITE; CAO-LORMEAU, 2016). No Brasil, ZIKV foi introduzido em 2014 (ZANLUCA 2016), com uma associação entre a infecção pelo vírus e distúrbios neurológicos em recém-nascidos e adultos (ALBUQUERQUE et al., 2018; KRAUER et al., 2017). Estudos de competência vetorial realizado no país demonstraram que mosquitos das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; COSTA-DA-SILVA et al., 2017a) são competentes na transmissão do vírus. Apesar desses estudos centrarem a atenção em mosquitos do gênero *Aedes*, outras espécies são encontradas em maior abundância em áreas de transmissão de ZIKV no país. Em Recife, epicentro da epidemia de ZIKV (ALBUQUERQUE et al., 2018), mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus* são encontrados na natureza em maior densidade populacional do que *A. aegypti*.

Desta forma, alguns grupos de pesquisa nos Estados Unidos, Brasil e China realizaram experimentos de competência vetorial para ZIKV utilizando mosquitos do gênero *Culex*, porém, os resultados foram divergentes. A capacidade de transmissão de ZIKV por populações de *C. quinquefasciatus* foi evidenciado no Brasil e na Flórida (GUEDES et al., 2017a; SMARTT et al., 2018) e um estudo realizado na China demonstrou a competência vetorial utilizando um modelo animal (GUO et al., 2016). Elizondo-Quiroga e colaboradores (2017) investigaram a presença desse vírus em populações de campo de diferentes espécies e detectaram a presença de ZIKV na glândula salivar de *C. quinquefasciatus* capturados na natureza. Entretanto, alguns trabalhos também realizados no Brasil e nos Estados Unidos apresentaram resultados que demonstraram a não competência vetorial da espécie (AMRAOUI et al., 2016; FERNANDES et al., 2016), discordando em relação aos trabalhos citados anteriormente. A nossa investigação corroborou com a hipótese de que outras espécies, como o *C. quinquefasciatus*, estão envolvidas no ciclo de transmissão de ZIKV em ambientes urbanos.

A epidemiologia molecular através do sequenciamento genômico é de extrema importância uma vez que é possível identificar a origem de vírus circulantes, elucidar dinâmicas de transmissão e correlacionar com os dados epidemiológicos reportados (FARIA et al., 2017; GRUBAUGH et al., 2019). No nosso estudo, a partir do sequenciamento viral de nova geração

diretamente de amostras de populações naturais de mosquitos da RMR foi possível analisar genomas provindos do epicentro da epidemia de ZIKV de 2015-2016. A análise filogenética dos oito genomas montados mostrou que todos pertencem à linhagem asiática / americana de ZIKV, o que foi evidenciado em dois dos cinco principais clados que se diversificaram durante essas epidemias. A linhagem asiática/americana de ZIKV foi relatada por Faria e colaboradores (2016) com evidencia de que a linhagem americana de ZIKV foi introduzida na América tendo como via de entrada o Brasil. Nesse mesmo estudo foi visto que ZIKV teria sido introduzido no Brasil em 2013, durante a Copa das Confederações, tal evento incluía jogadores da Polinésia Francesa (local onde havia circulação de ZIKV do genótipo asiático) (FARIA et al., 2016). Um segundo estudo de epidemiologia genômica de ZIKV, a partir de análises filogenéticas de dezenas de amostras brasileiras indicou que o vírus foi introduzido no nordeste do Brasil para então ocorrer a disseminação continental do ZIKV (FARIA et al., 2017).

O estudo de Faria e colaboradores (2017) analisou amostras oriundas de pacientes acometidos por microcefalia, e essas sequencias divergiram das agrupadas no genótipo asiático. Entretanto, a linhagem asiática de ZIKV já foi caracterizada como mais neurovirulenta do que a africana (DUGGAL et al., 2017). Esse fator pode ter influenciado para que durante a epidemia de ZIKV no Brasil as complicações clínicas tenham sido mais evidenciadas do que durante as epidemias africanas. Os genomas obtidos no nosso estudo foram oriundos de localidades na RMR acometidas por uma alta incidência de microcefalia (ALBUQUERQUE et al., 2018). Também com base na localização geográfica das amostras descritas aqui e com as anteriormente sequenciadas no Brasil (FARIA et al., 2017) é possível observar a dispersão de ZIKV em diferentes regiões brasileiras. Por exemplo, no clado II, dois genomas obtidos de um *pool* de *A. aegypti* estão agrupados com dois genomas de ZIKV oriundos de amostras de humanos detectadas no Rio de Janeiro. As cidades de Recife e do Rio de Janeiro estão separadas por cerca de 2.200 quilômetros de distância, mas possuem um intenso fluxo populacional e de trânsito aéreo. O intenso fluxo populacional e facilidade de deslocamento são descritos como um dos fatores responsáveis por dispersão viral (GRUBAUGH et al., 2019).

A vigilância de arbovírus em mosquitos deve ser investigada paralelamente a vigilância em humanos. Em relação ao DENV, no ano de 2015, foram confirmados todos os sorotipos circulantes no Brasil, assim como no estado de PE. Porém os resultados encontrados em mosquitos relatados no presente estudo evidenciaram apenas a circulação de DENV2 na RMR (PE). Na população humana, esse sorotipo, representou apenas 0,7% dos casos confirmados e em PE foi o sorotipo menos incidente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016). Em 2016 com

a mudança do cenário epidemiológico (aumento expressivo no número de casos de arboviroses), a comparação entre vírus encontrados em humanos e em mosquitos ficou ainda mais importante. Em PE, apenas os vírus DENV1 e DENV3 foram confirmados em humanos, enquanto que nos mosquitos foi possível comprovar a circulação de DENV2 e DENV4 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017). A infecção por cada sorotipo difere em relação as manifestações clínicas, o que pode levar os doentes a não procurarem hospitais, assim como ao grande número de hospedeiros assintomáticos (BALMASEDA et al., 2006; BURKE, 2001). A discrepância entre dados de mosquitos e humanos já foi evidenciada em um estudo realizado com populações de *A. aegypti* de Cabo Verde (GUEDES et al., 2017b), que mostrou a circulação de DENV2 e DENV4 nas populações de mosquitos em amostras de 2014 e 2015. Entretanto, apenas o sorotipo 3 tinha sido identificado durante um surto de dengue no ano de 2009. Desde então, nenhum trabalho de vigilância com humanos ou mosquitos foi realizado no país após esse surto. Essa evidência é uma alerta de uma possível nova epidemia, uma vez que a população não tem imunidade contra esses outros sorotipos identificados nos mosquitos. Embora conflitantes esses resultados devem servir de alerta pela possibilidade de ocorrência também de casos graves, uma vez que a população de mosquitos na natureza pode realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro recém-imunizado com outros vírus ou sorotipos diferentes (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; VALIANT et al., 2018). O ano de 2017 foi marcado pela drástica redução no número de casos das três arboviroses em humanos, com a redução de mais de 83% no número de casos de dengue (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018a) porém o vírus (DENV2) continuou em circulação na população vetora, o que pode estar relacionado a infecção residual dos mosquitos na natureza (CARRINGTON; SIMMONS, 2014; NGUYEN et al., 2013).

Em relação à ZIKV e CHIKV em 2015, os primeiros casos das doenças foram relatados no Brasil. Apenas na região nordeste foram notificados 94% dos casos de CHIKV, e destes casos, em torno de 14% foram do estado de PE (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017) corroborando com os resultados do presente estudo que encontrou a presença de CHIKV em populações de mosquitos. Assim como foram encontradas altas taxas de infecção por ZIKV em mosquitos. No ano de 2016, em relação à notificação de ZIKV em humanos, os altos valores de MIR corroboram com o cenário da circulação viral naquele momento, uma vez que os mosquitos foram coletados no ano de epidemia de ZIKV (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017), ao contrário do que aconteceu para CHIKV. Em espécimes de mosquitos de campo não foi identificada a circulação em mosquitos, apesar da alta incidência vista na população humana

(BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017). O ano de 2017 foi marcado pela drástica redução no número de casos das três arboviroses em humanos, onde a situação epidêmica foi considerada finalizada e controlada, com a redução de mais de 34% no número de casos de chikungunya e 92% no número de casos de Zika, em comparação com o ano de 2016 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018a) Porém, nos mosquitos, os vírus ZIKV e CHIKV estavam circulantes com altos valores de MIR, sendo ZIKV o mais encontrado na população de mosquitos das espécies *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* no ano de 2017.

A investigação em populações de mosquitos de campo através de busca ativa, direcionada para locais com circulação viral conhecida, foi empregada neste estudo e mostrou que durante surtos epidêmicos na RMR os mosquitos são encontrados com altas taxas de infecção. Na Colômbia, um estudo realizado durante os anos de 2015 e 2016, utilizou uma estratégia de busca ativa que foi desenvolvida com intuito de prevenir a disseminação de ZIKV e também a introdução de arbovírus não circulantes na localidade (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2016). Para tal, foram desenhados mapas com pontos quentes na cidade de Tolima, assim, foi possível a utilização de estratégias de prevenção em relação a viajantes que se deslocavam para áreas endêmicas. Nos mapas de densidade de mosquitos infectados desenhados no presente estudo foi também possível identificar os pontos quentes para RMR. As regiões críticas identificadas estavam concentradas no município de Recife, e 10 bairros deste município foram identificados com a maior densidade de mosquitos infectados. Dentre eles, sete são de classe socioeconômica baixa ou média baixa, o que corrobora com o estudo realizado por De Souza e colaboradores (2018) , que identificou as áreas com condições de vida precárias em Recife estavam associadas com uma maior prevalência de microcefalia comparado aos bairros com melhores condições socioeconômicas. A identificação dos principais bairros com circulação viral pode também auxiliar as ações de prevenção de arboviroses, direcionando o controle vetorial, uma vez que as regiões com maior índice de pobreza em geral sofrem com uma maior infestação de mosquitos como *C. quinquefasciatus*.

Além de ter sido realizada durante a epidemia, a vigilância desempenhada na RMR foi feita no ano pós epidemia (2017) e os nossos resultados demonstraram a importância desse monitoramento em períodos com baixa notificação de número de casos em humanos, o que pode auxiliar em ações de prevenção de novos surtos de arboviroses (GU et al., 2008; HADLER et al., 2015). Como já foi visto em um estudo realizado na Espanha, onde a vigilância entomológica realizada em torno de viajantes foi eficaz na detecção precoce de DENV em mosquitos e, portanto, pode ajudar a prevenir a transmissão autóctone (HADLER et al., 2015).

Paules e colaboradores (2017) realçam também a importância da vigilância em relação a arbovírus com ciclos de transmissão silvestre, como o vírus da febre amarela (YFV) que continuam a ocorrer em regiões tropicais endêmicas. O mais recente surto de YFV no Brasil destaca esse fenômeno. No país várias espécies são competentes para transmissão do vírus e podem estar relacionadas aos casos silvestres (*Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes albiprivus*) ou urbanos (*A. aegypti* e *A. albopictus*) (COUTO-LIMA et al., 2017).

A recente tripla epidemia de DENV, ZIKV e CHIKV no Brasil teve efeito crítico no país, devido principalmente ao conjunto de fatores relevantes encontrados no país, como por exemplo alto grau de urbanização, saneamento básico inadequado, mudanças climáticas e altas densidades de mosquitos competentes para transmissão de inúmeros vírus (HUBER et al., 2018; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). Frente a este cenário, as complicações clínicas relacionadas a infecções podem ocorrer devido a coinfeção por dois ou mais arbovírus (RÜCKERT et al., 2017; VOGELS et al., 2019) o que reforça a necessidade de uma constante vigilância entomológica, que envolva a detecção de vírus em mosquitos, ser empregada em localidades estratégicas envolvendo diferentes espécies de mosquitos. A partir desses dados é importante salientar que a vigilância entomológica através da busca ativa de diferentes espécies de mosquitos, pode elucidar surtos, assim como prevenir ou atenuar a dispersão viral local em futuros surtos.

## 11 CONCLUSÕES

- a) Durante o período que compreende os anos de 2015 a 2017, os arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV estavam em circulação em populações de mosquitos da RMR. Estes dados demonstram a importância da vigilância vetorial continuada, de forma que possa antever períodos de surtos ou epidêmicos;
- b) A taxa de infecção por ZIKV em mosquitos foi mais elevada em *C. quinquefasciatus* (2017) e *A. aegypti* (2015). O que sugere o envolvimento de diferentes espécies de mosquitos no ciclo de transmissão dos arbovírus, visto que em pools de fêmeas não ingeridas também se apresentaram positivos;
- c) A maior incidência de arbovírus em mosquitos encontrada foi a de ZIKV em *C. quinquefasciatus* no ano de 2017, demonstrando que diferentes espécies podem estar envolvidas no ciclo de transmissão de ZIKV. DENV, por sua vez, mesmo com o constante número de casos da doença, foi evidenciada a menor taxa de infecção;
- d) As análises filogenéticas identificaram que o genótipo de ZIKV circulante na RMR é de origem Asiática, considerado o genótipo mais neurovirulento desse vírus. O que pode estar relacionado as complicações clínicas reportadas em PE e em outros estados. Além disso, os dados obtidos através dos mosquitos demonstram que ZIKV já se encontravam circulante na região, uma vez que as sequências obtidas foram agrupadas filogeneticamente com outras obtidas na Paraíba e Rio de Janeiro;
- e) A maior circulação viral, neste estudo, foi verificada em áreas urbanas de bairros de classe média baixa da RMR. O que demonstra a necessidade de ações intensificadas de controle de mosquitos como *C. quinquefasciatus* nessas áreas.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. D. F. P. M. et al. The microcephaly epidemic and Zika virus: building knowledge in epidemiology. **Cad. de Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 10, p. 1-13, Out. 2018. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/csp/v34n10/en\\_1678-4464-csp-34-10-e00069018.pdf](http://www.scielo.br/pdf/csp/v34n10/en_1678-4464-csp-34-10-e00069018.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2019.
- AMRAOUI, F. et al. Culex mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. **Euro Surveill.**, Saint-Maurice, v. 21, n. 35, p. 1-4, Set. 2016.
- ANDREADIS, T. G. The contribution of Culex pipiens complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 28, n. 4 Suppl, p. 137-151, Dez. 2012.
- ANDRIES, A.-C. et al. Value of routine dengue diagnostic tests in urine and saliva specimens. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e0004100, Set. 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004100>>. Acesso em: 14 jan. 2019.
- ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. **Syst. Biol.**, Basingstoke, v. 55, n. 4, p. 539-552, Ago. 2006.
- ARAGÃO, C. F. et al. Circulation of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. **Acta Trop.**, Basel, v. 186, p. 1-4, Out. 2018.
- ARAÚJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 253-255, Mar. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/anp/v74n3/0004-282X-anp-74-03-0253.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- ARNELL, J. H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIII - A revision of the Scapularis group of Aedes (Ochlerotatus). **American Entomological Institute**, Logan, v. 13, n. 3, p. 1-144, 1976. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Arnell%201976.pdf>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.
- AYLLON, T. et al. Early evidence for Zika virus circulation among *Aedes aegypti* mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v. 23, n. 8, p. 1411-1412, Ago. 2017.

AYRES, C. F. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 3, p. 278-279, Mar. 2016.

AYRES, C. F. et al. Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Parasit Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 220, Mai. 2019. Disponível em: <  
<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3461-4>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

BALMASEDA, A. et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 74, n. 3, p. 449-456, Mar. 2006.

BARBOSA, P. et al. Vector surveillance for dengue virus detection in the archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. **J Med Entomol.**, Honolulu, v. 53, n. 3, p. 613-619, Mai. 2016.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 504-507, Abr. 2013.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.  
 Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, Brasília: Ministério da Saúde, v. 47, n. 3, 2015.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.  
 Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, Brasília: Ministério da Saúde, v. 48, n. 3, 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.  
 Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 37, Brasília: Ministério da Saúde, v. 47, n. 34, 2016a.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.  
 Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, Brasília: Ministério da Saúde, v. 49, n. 2, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.  
 Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45, Brasília: Ministério da Saúde, v. 49, 2018.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52. Brasília: Ministério da Saúde, v. 50, n. 4, 2018.

BOORMAN, J. P.; PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, London, v. 50, n. 3, p. 238-242, Mai. 1956.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 113-118, Jun. 2007. Disponível em: <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742007000200006](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000200006)>. Acesso em: 18 jan. 2019.

BRASIL. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, Ministério da Saúde, v. 7., 2009.

BRINKMANN, A.; NITSCHKE, A.; KOHL, C. Viral metagenomics on blood-feeding arthropods as a tool for human disease surveillance. **Int J Mol Sci.**, Basel, v. 17, n. 10, p. 1743, Out. 2016. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/17/10/1743>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

BURKE, D. Flaviviruses. In: GUBLER, J. D.; KUNO, G. MARKOFF, L. **Fields Virology**. Filadélfia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1043-1125.

BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, London, v. 379, n. 9816, p. 662-671, Fev. 2012.

CALIFÓRNIA. I Naturalist. *Aedes scapularis*. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/photos/30682361>>. Acesso em: 22 Jan 2019.

CAMPBELL, G. L. et al. West Nile virus. **Lancet Infect Dis**, New York, v. 2, n. 9, p. 519-529, Set. 2002.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, Out. 2015.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, Jun. 2014.

CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Front Immunol.**, London, v. 5, p. 290, Jun. 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00290/full>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. **Lancet**, London, v. 387, n. 10033, p. 2125-2132, Mar. 2016.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya and dengue viruses**. Atlanta, 2016. Disponível em: <<https://www.idahoperinatal.org/documents/CDC-zika-testing-algorithm.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

CEVALLOS, V. et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. **Acta Trop.**, Basel, v. 177, p. 74-80, Jan. 2018.

CHANG, A. Y. et al. Frequency of chronic joint pain following chikungunya virus infection: a Colombian cohort study. **Arthritis Rheumatol.**, Malden, v. 70, n. 4, p. 578-584, Abr. 2018.

CHANG, L.-J. et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet**, London, v. 384, n. 9959, p. 2046-2052, Dez. 2014.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0004543, Mar. 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004543>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

CHOW, V. T. et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **Am J Trop Med Hyg.**, Baltimore, v. 58, n. 5, p. 578-586, Mai.1998.

CIGARROA-TOLEDO, N. et al. Chikungunya virus in febrile humans and *Aedes aegypti* mosquitoes, Yucatan, Mexico. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 22, n. 10, p. 1804-1807, Out. 2016.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol.**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 191-203, Nov. 2012.

COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol.**, London, v. 8, n. 2, p. 155-176, Fev. 2013.

CONSOLI, R. A.; DE OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, 1994. p. 228.

CORDEIRO, M. T. et al. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. **Lancet**, London, v. 387, n. 10030, p. 1811-1812, Abr. 2016.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. e0171951, 2017a. Fev. 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171951>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0005630, Jun. 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005630>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

COUTO-LIMA, D. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. **Sci Rep.**, London, v. 7, n. 1, p. 4848, Jul. 2017. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05186-3>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

DE SOUZA, W. V. et al. Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **BMC Public Health**, London, v. 18, n. 1, p. 130, Jan. 2018. Disponível em: < <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-018-5039-z>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

DELATTE, H. et al. *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. **Parasite**, Paris, v. 15, n. 1, p. 3-13, Mar. 2008.

DIALLO, D. et al. Arboviruses isolated from the Barkedji mosquito-based surveillance system, 2012-2013. **BMC Infect Dis.**, London, v. 18, n. 1, p. 642, Dez. 2018. Disponível em: < <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3538-2>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e109442, Out. 2014. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109442>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, London, v. 46, n. 5, p. 509-520, Set. 1952.

DISEASES, T. L. I. The dengue vaccine dilemma. **Lancet Infect Dis.**, New York, v. 18, n. 2, p. 123, Fev. 2018.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev Saude Publica.**, São Paulo, v. 51, p. 30, Abr. 2017.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med.**, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, Jun. 2009.

DUGGAL, N. K. et al. Differential neurovirulence of African and Asian genotype Zika virus isolates in outbred immunocompetent mice. **Am J Trop Med Hyg.**, Baltimore, v. 97, n. 5, p. 1410-1417, Nov. 2017.

EASTWOOD, G. et al. *Aedes taeniorhynchus* vectorial capacity informs a pre-emptive assessment of West Nile virus establishment in Galapagos. **Sci Rep.**, London, v. 3, p. 1519, Mar. 2013. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/srep01519>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

ELIZONDO-QUIROGA, D. et al. Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **SciRep.**, London, v. 8, p. 809, Mai. 2018. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-017-18682-3>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

EPELBOIN, Y. et al. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 11, n. 11, p. e0005933, Nov. 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005933>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

FANTINATO, F. F. S. T. et al. Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 25, p. 683-690, Set. 2016. Disponível em: <

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2237-96222016000400683](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000400683)>.  
Acesso em: 14 fev. 2019.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, London, v. 546, n. 7658, p. 406-410, Jun. 2017.

FARIA, N. R. et al. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. **Genome Med.**, London, v. 8, n. 1, p. 97, Set. 2016. Disponível em: <  
<https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-016-0356-2> >. Acesso em: 14 fev. 2019.

FAUVER, J. R. et al. Temporal and spatial variability of entomological risk indices for West Nile virus infection in Northern Colorado: 2006–2013. **J Med Entomol.**, Honolulu, v. 53, n. 2, p. 425-434, Dez. 2015.

FERNANDES, R. S. et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. e0004993, Set. 2016. Disponível em: <  
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004993>. Acesso em: 13 mar. 2019.

FERREIRA-DE-BRITO, A. et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 10, p. 655-658, Out. 2016.

FIGUEIREDO, R. M. P. D. et al. Identification of dengue viruses in naturally infected *Aedes aegypti* females captured with BioGents (BG)-Sentinel traps in Manaus, Amazonas, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 46, n. 2, p. 221-222, Abr. 2013. Disponível em: <  
<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v46n2/0037-8682-rsbmt-46-02-221.pdf>>. Acesso: 10 mar. 2019.

FLIES, E. J. et al. Converting Mosquito Surveillance to Arbovirus Surveillance with Honey-Baited Nucleic Acid Preservation Cards. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Larchmont, v. 15, n. 7, p. 397-403, Jul. 2015.

FLÓRIDA. Universidade da Flórida. **Bloodfeeding female *Aedes taeniorhynchus***. Disponível em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/in1035>> . Acesso em: 22 Jan 2019.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasit Vectors.**, London, v. 5, n. 1, p. 272, Nov. 2012. Disponível em: <

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-272>>. Acesso em: 12 já. 2019.

FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 10-survey of adult behaviour of *Culex nigripalpus* and other species of *Culex* (*Culex*) in South-Eastern Brazil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, p. 271-278, Ago. 1995. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v29n4/03.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

FRANZ, A. W. et al. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, Basel, v. 7, n. 7, p. 3741-3767, Jul. 2015. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1999-4915/7/7/2795>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

GÖERTZ, G. P. et al. Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0005654, 2017. Jun. 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005654>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

GOURINAT, A.-C. et al. Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 1, p. 84, Jan. 2015.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Filadélfia, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 651-686.

GRUBAUGH, N. D. et al. Tracking virus outbreaks in the twenty-first century. **Nat Microbiol.**, London, v. 4, n. 1, p. 10, Jan. 2019. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41564-018-0296-2>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

GU, W. et al. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, London, v. 102, n. 8, p. 817-822, Ago. 2008.

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Trop Med Health.**, Nagasaki, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S3-S11, Dez. 2011.

GUEDES, D. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **J Vector Borne Dis.**, Delhi, v. 47, n. 2, p. 67-76, Jun. 2010. Disponível em: < <http://www.mrcindia.org/journal/issues/472067.pdf>>. Acesso: 10 jan. 2019.

GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg Microbes Infect.**, New York, v. 6, n. 8, p. e69, Ago. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2017.59>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

GUEDES, D. R. D. et al. Circulation of DENV2 and DENV4 in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Praia, Santiago Island, Cabo Verde. **J Insect Sci.**, Tucson, v. 17, n. 4, p. 6, Jul. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jinsectscience/article/17/4/86/3966735>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

GUERBOIS, M. et al. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. **J Infect Dis.**, Chicago, v. 214, n. 9, p. 1349-1356, Nov. 2016.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol.**, Washington, v. 59, n. 3, p. 307-321, Mai. 2010.

GUO, X. X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerg Microbes Infect.**, New York, v. 5, n. 9, p. e102, Set. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2016.102>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 36, p. S40-S42, Nov. 2010.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol.**, London, v. 8, n. 12supp, p. S7, Dez. 2010.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, London, v. 385, n. 9966, p. 453-465, Jan. 2015.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Viruses**, Basel, v. 2, n. 12, p. 2649-2662, Dez. 2010. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/2/12/2649>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

HADLER, J. L. et al. Assessment of arbovirus surveillance 13 years after introduction of West Nile virus, United States. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 7, p. 1159-1166, Jul. 2015.

HALL-MENDELIN, S. et al. FTA cards facilitate storage, shipment, and detection of arboviruses in infected *Aedes aegypti* collected in adult mosquito traps. **Am J Trop Med Hyg.**, Baltimore, v. 96, n. 5, p. 1241-1243, Mai. 2017.

HALL, R. A. et al. Advances in arbovirus surveillance, detection and diagnosis. **J Biomed Biotechnol.**, Akron, v. 2012, Mai. 2012.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 15, n. 9, p. 1347, Set. 2009.

HIRAYAMA, T. et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 50, n. 6, p. 2047-2052, Jun. 2012.

HONÓRIO, N. A. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 191-198, Mar. 2003.

HRIBAR, L. J.; DEMAY, D. J.; LUND, U. J. The association between meteorological variables and the abundance of *Aedes taeniorhynchus* in the Florida Keys. **J Vector Ecol.**, Santa Ana, v. 35, n. 2, p. 339-346, Dez. 2010.

HUBER, J. H. et al. Seasonal temperature variation influences climate suitability for dengue, chikungunya, and Zika transmission. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0006451, Mai. 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006451>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

HUERTA, H. et al. Detection of Zika virus in *Aedes* mosquitoes from Mexico. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, London, v. 111, n. 7, p. 328-331, Jul. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), Censo 2010. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>>. Acesso em: 10 Mar. 2019.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect.**, Paris, v. 44, n. 7, p. 302-307, Jul. 2014.

JARMAN, R. G. et al. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. **Am J Trop Med Hyg.**, Baltimore, v. 84, n. 2, p. 218-223, Fev. 2011.

JUPP, P.; MCINTOSH, B.; BLACKBURN, N. Experimental assessment of the vector competence of *Culex (Culex) neavei* Theobald with West Nile and Sindbis viruses in South Africa. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, London, v. 80, n. 2, p. 226-230, Jan. 1986.

KRAEMER, M. U. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, Cambridge, v. 4, p. e08347, Jun. 2015. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/08347>>. Acesso em: 10. jan. 2019.

KRAUER, F. et al. Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain–Barré syndrome: systematic review. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 14, n. 1, p. e1002203, Jan. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002203>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **Eur J Intern Med.**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 325-329, Jun. 2012.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 13, n. 5, p. 764-767, Mai. 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, Ago. 2008.

LEE, A. J. et al. Identification of diagnostic peptide regions that distinguish Zika virus from related mosquito-borne Flaviviruses. **PLoS One.**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0178199, Mai. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0178199>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J.-E.; GASCUEL, O. SMS: smart model selection in PhyML. **Mol Biol Evol.**, Chicago, v. 34, n. 9, p. 2422-2424, Set. 2017.

LESSER, J.; KITRON, U. A geografia social do zika no Brasil. **Estud. av.**, São Paulo, v. 30, n. 88, p. 167-175, Set. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v30n88/0103-4014-ea-30-88-0167.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

LI, M. I. et al. Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e1792, Ago. 2012. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001792>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

LUO, Q. A study on transmission of dengue virus by *Culex fatigans*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.**, Beijing, v. 14, n. 2, p. 67-69, Abr. 1993.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; VALLE, D. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil. **Bull World Health Organ.**, Geneva, v. 92, p. 685-689, Set. 2014.

MADEIRA, B. G. et al. Changes in tree and liana communities along a successional gradient in a tropical dry forest in south-eastern Brazil. **Plant Ecol.** Amsterdam, v. 201, p. 291-304. Jan. 2019.

MANIMEGALAI, K.; SUKANYA, S. Biology of the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.** Tamilnadu, v. 3, n. 4, p. 718-724, 2014.

MARQUARDT, W. H. **Biology of disease vectors.** Elsevier, p. 1-816, 2004.

MARQUEZAN, M. C. et al. Ocular effects of Zika virus—a review. **Surv Ophthalmol.**, New York, v. 63, n. 2, p. 166-173, Mar. 2018.

MARTINS, V. E. P. et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PLoS One.**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e41386, Jul. 2012. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0041386>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

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.**, San Francisco, v. 13, n. 3, p. e0194108, Mar. 2018. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194108>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 138-146, Mar. 2014.

MITCHELL, C. J.; FORATTINI, O. P. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. **J Med Entomol.**, Honolulu, v. 21, n. 1, p. 34-37, Jan. 1984.

MORON, A. et al. Microcephaly associated with maternal Zika virus infection. **BJOG**, Oxford, v. 123, n. 8, p. 1265-1269, Mai. 2016.

MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1887, Out. 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, v. 29, n. 3, p. 487-524, Jul. 2016.

NAYAR, J.; ROSEN, L.; KNIGHT, J. W. Experimental vertical transmission of Saint Louis encephalitis virus by Florida mosquitoes. **Am J Trop Med Hyg.**, Baltimore, v. 35, n. 6, p. 1296-1301, Nov. 1986.

NGUYEN, N. M. et al. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v. 110, n. 22, p. 9072-9077, Mai. 2013.

OLIVEIRA, A. S. D. et al. **Rev. bras. anal. clin.**, Viçosa, v. 43, n. 2, p. 125-130, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020, Geneve, 2012. Disponível em: <<https://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue Vaccine: WHO position paper, 2016. v. 30, p. 349-364, 2016b. Disponível em: <[https://www.who.int/immunization/policy/position\\_papers/WHO\\_position\\_paper\\_dengue\\_2016\\_references.pdf](https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/WHO_position_paper_dengue_2016_references.pdf)>. Acesso em: 11 Jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global vector control response 2017-2030, Geneve. 2017 Disponível em: <<https://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/en/>>. Acesso em: 11 Jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMÉRICA DA SAÚDE. Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas: Interim guidance for laboratory detection and diagnosis, Washington, 2015. Disponível em: < <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/18602>>. Acesso em: 11 Jan. 2019.

ORTIZ, D. I.; WEAVER, S. C. Susceptibility of *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) to infection with epizootic (subtype IC) and enzootic (subtype ID) Venezuelan equine encephalitis viruses: evidence for epizootic strain adaptation. **J Med Entomol.**, Honolulu, v. 41, n. 5, p. 987-993, Set. 2004.

PAGÈS, F. et al. *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. **PLoS One.**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. e4691, Mar. 2009. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004691>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Glob Health.**, London, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, Jan. 2018. Disponível em: < [https://gh.bmj.com/content/3/Suppl\\_1/e000530](https://gh.bmj.com/content/3/Suppl_1/e000530)>. Acesso em: 18 fev. 2019.

PETALING JAYA. **Ilustración digital del ciclo de vida del mosquito**. Petaling Jaya, 2019. Disponível em: < [https://es.123rf.com/photo\\_50519050\\_ilustraci%C3%B3n-digital-del-ciclo-de-vida-del-mosquito.html](https://es.123rf.com/photo_50519050_ilustraci%C3%B3n-digital-del-ciclo-de-vida-del-mosquito.html)>. Acesso em: 22 Jan 2019.

PIERSON, T.C and DIAMOND, M. S. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Filadélfia, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 747-794.

PITISUTTITHUM, P.; BOUCKENOOGHE, A. The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. **Expert Rev Vaccines.**, London, v. 15, n. 7, p. 795-798, Jul. 2016.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 108, p. 11-17, Out. 2013.

POWERS, A. M. Genomic evolution and phenotypic distinctions of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **Exp Biol Med.**, Maywood, v. 236, n. 8, p. 909-914, Ago. 2011.

RAMSAUER, K. et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-

comparator, first-in-man trial. **Lancet Infect Dis.**, New York, v. 15, n. 5, p. 519-527, Mai. 2015.

REINER JR, R. C. et al. Quantifying the epidemiological impact of vector control on dengue. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0004588, Mai. 2016. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004588>>. Acesso em: 19 Fev. 2019.

REY, J. et al. North American wetlands and mosquito control. **Int J Environ Res Public Health.**, Basel, v. 9, n. 12, p. 4537-4605, Dez. 2012.

RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T.; CAO-LORMEAU, V. M. Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. e0005024, Set. 2016. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005024>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

RICHARDS, S. L. et al. Environmental and biological factors influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) vector competence for Saint Louis encephalitis virus. **Am J Trop Med Hyg.**, Baltimore, v. 81, n. 2, p. 264-272, Ago. 2009.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. Mapping Zika virus infection using geographical information systems in Tolima, Colombia, 2015-2016. **F1000Res.**, London, v. 5, Abr. 2016. Disponível em: < <https://f1000research.com/articles/5-568/v1>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. et al. Prevalence of post-chikungunya infection chronic inflammatory arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Arthritis Care Res.**, Hoboken, v. 68, n. 12, p. 1849-1858, Dez. 2016.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol.**, London, v. 11, n. 8, p. 532, Jul. 2011. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nri3014>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

RÜCKERT, C. et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nat Commun.**, London, v. 8, p. 15412, Mai. 2017. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/ncomms15412>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. In: *Seminars in pediatric neurology*. Elsevier, 2012. p.130-151.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiol.**, London, v. 7, p. 9, Jan. 2007. Disponível em: < <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-7-9>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

SANTOS, C. F. et al. Inventory of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in conservation units in Brazilian Tropical dry forests. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 227-232, Mai. 2015. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v57n3/0036-4665-rimtsp-57-03-0227.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2019.

SANTOS, N. S. C. and SOARES, C. C. Viroses entéricas. In: SANTOS, N. S. C., **Introdução à Virologia Humana**. Terceira edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2015. p. 409-502.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde. **Ciclo de vida do *Aedes aegypti***. São Paulo, 2019. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/arboviroses/vetores>> . Acesso em: 22 Jan 2019.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med**, San Francisco, v. 3, n. 7, p. e263, Mai. 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

SCOTT, T. W. et al. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. **J Med Entomol**, Honolulu, v. 30, n. 1, p. 94-99, Jan. 1993.

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, Jan. 2016.

SHAW, W. R.; CATTERUCCIA, F. Vector biology meets disease control: Using basic research to fight vector-borne diseases. **Nat Microbiol**, London, v. 4, p. 20-34, Ago. 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0214-7>>. Acesso em: 20 Jan. 2019.

SHI, C. et al. A metagenomic survey of viral abundance and diversity in mosquitoes from Hubei province. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0129845, Jun. 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129845>>. Acesso em: Dez. 2018.

SMARTT, C. T. et al. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) From Florida Transmitted Zika Virus. **Front Microbiol.**, Lausanne, v. 9, p. 768, Abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00768>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

SOUTH BEND. VectorBase. **Aedes species**. South Bend, 2019. Disponível em: <<https://www.vectorbase.org/image-gallery/Aedes%20Species>>. Acesso em: 22 Jan 2019.

SOUTH BEND. VectorBase. **Culex species**. South Bend, 2019. Disponível em: <<https://www.vectorbase.org/image-gallery/Culex%20Species/C.%20quinquefasciatus>>. Acesso em: 22 Jan 2019.

STEINER, C. D. et al. scented sugar baits enhance detection of St. Louis encephalitis and West Nile viruses in mosquitoes in suburban California. **J Med Entomol**, Honolulu, v. 55, n. 5, p. 1307-1318, Ago. 2018.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**, Washington v. 58, n. 3, p. 491-562, Set. 1994.

TURELL, M. J. Members of the *Culex pipiens* Complex as Vectors of Viruses1. **J Am Mosq Control Assoc**, Fresno, v. 28, n. 4s, p. 123-127, Dez. 2012.

VALIANT, W. G. et al. Human Serum With High Neutralizing Antibody Titers Against Both Zika and Dengue Virus Shows Delayed In Vitro Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Open Forum Infect Dis**, CIDADE, v. 5, n. 7, p. ofy151, Jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ofid/ofy151>>. Acesso em: 11 Jan. 2019.

VAN BORTEL, W. et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. **Euro Surveill**, Saint-Maurice, v. 19, n. 13, Abr. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20759>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

VAZEILLE-FALCOZ, M. et al. Replication of dengue type 2 virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 319-321, Fev. 1999.

VAZEILLE, M. et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS One**, San Francisco. v. 2, n. 11, p. e1168, Nov. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

VEGA-RUA, A. et al. Chikungunya Virus Replication in Salivary Glands of the *Mosquito Aedes albopictus*. **Viruses**, Basel, v. 7, n. 11, p. 5902-5907, Nov. 2015.

VEGA-RUA, A. et al. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **J Virol**, Washington. v. 88, n. 11, p. 6294-6306, Jun. 2014.

VLACH, J. J. et al. Interisland dispersal of the black salt marsh mosquito, *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in the Florida Keys. **J Am Mosq Control Assoc**, Fresno, v. 22, n. 4, p. 615-622, Dez. 2006.

VOGELS, C. B. et al. Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? **PLoS Biol**, San Francisco, v. 17, n. 1, p. e3000130, Jan. 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000130>>. Acesso em: 10 Fev. 2019.

VYTHILINGAM, I. et al. New paradigms for virus detection, surveillance and control of Zika virus vectors in the settings of Southeast Asia. **Front Microbiol.**, Lausanne, v. 7, p. 1452, Set. 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01452>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

WAGGONER, J. J. et al. Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. **Emerg Infect Dis**, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1295, Jul. 2016a. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.16036>>. Acesso em: 11 Jan. 2019

WAGGONER, J. J. et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, chikungunya virus, and dengue virus. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 63, n. 12, p. 1584–1590, Dez. 2016b.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 54, n. 4, p. 860-867, Abr. 2016.

WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 83, n. 3, p. 690-695, Set. 2010.

WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. **Annu Rev Med**, Palo Alto, v. 69, p. 395-408, Jan. 2018.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**, Boston, v. 372, n. 13, p. 1231-1239, Mar. 2015.

WEAVER, S. C. et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert Rev Vaccines**, London, v. 11, n. 9, p. 1087-1101, Set. 2012.

WEINBREN, M.; WILLIAMS, M. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v. 52, n. 3, p. 263-268, Mai. 1958.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, Jun. 2015.

ZARA, A. L. D. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 25, p. 391-404, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.5123/s1679-49742016000200017>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

## APÊNDICE A – TABELA DE DESCRIÇÃO DAS COLETAS

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continua)								
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
1	AVENIDA GENERAL SAN MARTIN - CORDEIRO	HOSPITAL GETÚLIO VARGAS	CORDEIRO	RECIFE	404	5	17	-
2	AVENIDA CONSELHEIRO ROSA E SILVA - ESPINHEIRO	HOSPITAL DOS SERVIDORES DO ESTADO	ESPINHEIRO	RECIFE	63	1	4	-
3	RUA JOÃO FERNANDES VIÊIRA - BOA VISTA	LABORATÓRIO CENTRAL - PERNAMBUCO	BOA VISTA	RECIFE	36		1	-
4	AVENIDA CAXANGÁ - 3860 - IPUTINGA	HOSPITAL BARÃO DE LUCENA	IPUTINGA	RECIFE	33	1	2	-
5	AVENIDA AGAMENON MAGALHÃES - DERBY	HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO	DERBY	RECIFE	50	1	3	-
6	AVENIDA RECIFE - 810 - ESTÂNCIA	HOSPITAL GERAL DE AREIAS	ESTÂNCIA	RECIFE	29	-	1	-
7	AVENIDA GENERAL MANUEL RABELO - 126 - ENGENHO VELHO	HOSPITAL MEMORIAL DE JABOATÃO	ENGENHO VELHO	JABOATÃO DOS GUARARAPES	5	-	1	-
8	RUA APRÍGIO GUIMARÃES - TEJIPIO	HOSPITAL OTÁVIO DE FREITAS	TEJIPIÓ	RECIFE	112	-	1	-
9	RUA 1 - 934 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
10	RUA 1 - 970 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
11	RUA 1 - 962 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
12	RUA 18 - 60 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	8	-	-	-
13	RUA 18 - 222 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
14	RUA 18 - 84 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-

**Tabela1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continuação)

COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
15	RUA 18 - 186 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
16	RUA 18 - 24 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	3	-	-	-
17	RUA 18 - 74 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
18	RUA 18 - 108 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	3	-	-	-
19	RUA 18 - 36 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
20	RUA 20 - 181 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
21	RUA 20 - 45 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
22	RUA 20 - 61 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	3	-	-	-
23	RUA 20 - 125 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
24	RUA 20 - 144 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
25	RUA 20 - 149 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
26	RUA 20 - 21 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
27	RUA 23 - 53 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continuação)

COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
28	RUA 23 - 6 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
29	RUA 24 - 22 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
30	RUA 24 - 158 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
31	RUA 24 - 141 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	3	-	-	-
32	RUA 24 - 117 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
33	RUA 25 - 22 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
34	RUA 25 - 158 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
35	RUA 25 - 141 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
36	RUA 25 - 165 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
37	RUA 25 - 117 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	13	-	-	-
38	RUA 25 - 142 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
39	RUA 26 - 29 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	6	-	-	-
40	RUA 26 - 41 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continuação)

COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
41	RUA 26 - 33 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
42	RUA 26 - 59 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
43	RUA 28 - 21 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
44	RUA 28 - 70 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
45	RUA 28 - 46 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
46	RUA 29 - 144 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
47	RUA 29 - 24 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
48	RUA 29 - 156 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
49	RUA 29 - 108 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
50	RUA 29 - 138 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
51	RUA 29 - 126 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
52	RUA 31 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
53	RUA TRINTA E OITO - 30 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continuação)								
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
54	RUA TRINTA E OITO - 36 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
55	RUA TRINTA E OITO - 60 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
56	RUA TRINTA E NOVE - 114 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	4	-	-	-
57	RUA TRINTA E NOVE - 84 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	4	-	-	-
58	RUA TRINTA E NOVE - 144 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
59	RUA TRINTA E NOVE - 69 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
60	RUA QUARENTA - 131 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	1	-	-
61	RUA QUARENTA - 60 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	5	1	-	-
62	RUA QUARENTA - 36 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
63	RUA QUARENTA E UM - 132 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
64	RUA QUARENTA E UM - 156 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-
65	RUA QUARENTA E UM - 65 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-
66	RUA QUARENTA E UM - 144 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

									(Continuação)
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV	
67	RUA QUARENTA E UM - 71 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-	
68	RUA QUARENTA E DOIS - 11 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	1	
69	RUA QUARENTA E DOIS - 71 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	1	
70	RUA QUARENTA E DOIS- 23 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	6	-	-	-	
71	RUA QUARENTA E DOIS - 137 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-	
72	RUA QUARENTA E DOIS - 107 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	1	-	-	-	
73	RUA QUARENTA E DOIS - 160 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-	
74	RUA QUARENTA E DOIS - 125 - PARQUE CAPIBARIBE	RESIDÊNCIA	PARQUE CAPIBARIBE	SÃO LOURENÇO DA MATA	2	-	-	-	
75	AVENIDA GENERAL SAN MARTIN - CORDEIRO	HOSPITAL GETÚLIO VARGAS	CORDEIRO	RECIFE	20	-	3	-	
76	AVENIDA CONSELHEIRO ROSA E SILVA - ESPINHEIRO	HOSPITAL DO SERVIDORES DO ESTADO	ESPINHEIRO	RECIFE	12	-	5	-	
77	AVENIDA AGAMENON MAGALHÃES - DERBY	HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO	DERBY	RECIFE	12	-	4	-	
78	AVENIDA RECIFE - 810 - ESTÂNCIA	HOSPITAL GERAL DE AREIAS	ESTÂNCIA	RECIFE	51	-	1	-	
79	RUA APRÍGIO GUIMARÃES - TEJIPIO	HOSPITAL OTÁVIO DE FREITAS	TEJIPIÓ	RECIFE	69	1	6	-	
80	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - 1235 - CIDADE UNIVERSITÁRIA	HOSPITAL DAS CLÍNICAS	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	744	1	21	-	

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continuação)								
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
81	AV. NORTE MIGUEL ARRAES DE ALENCAR - 6465 - CASA AMARELA	POLICLÍNICA E MATERNIDADE PROFESSOR BARROS LIMA	CASA AMARELA	RECIFE	4	-	-	-
82	RUA CÔNEGO BARATA - 822 - TAMARINEIRA	HOSPITAL DE PEDIATRIA HELENA MOURA	TAMARINEIRA	RECIFE	9	-	-	-
83	AVENIDA CONSELHEIRO ROSA E SILVA - 2130 - TAMARINEIRA	HOSPITAL ULISSES PERNAMBUCO	TAMARINEIRA	RECIFE	20	-	1	-
84	RUA ARNÓBIO MARQUÊS - 310 - SANTO AMARO	HOSPITAL OSWALDO CRUZ	SANTO AMARO	RECIFE	4	-	-	-
85	AVENIDA CAXANGÁ - 3860 - IPUTINGA	HOSPITAL BARÃO DE LUCENA	IPUTINGA	RECIFE	4	-	-	-
86	RUA VALÊ DO ITAJAÍ - IBURA	UPA IBURA	IBURA	RECIFE	16	-	1	-
87	RUA GENERAL MANOEL RABELO - ENGENHO VELHO	UPA ENGENHO VELHO	ENGENHO VELHO	JABOATÃO DOS GUARARAPES	13	-	-	-
88	RUA LEONARDO DA VINCI - 68 - CURADO II	UPA CURADO	CURADO II	JABOATÃO DOS GUARARAPES	26	-	5	-
89	AVENIDA JOAQUIM NABUCO - CIDADE TABAJARA	UPA OLINDA	CIDADE TABAJARA	OLINDA	102	-	3	-
90	RUA MIRABELA - 30 - TORRÕES	UPA TORRÕES	TORRÕES	RECIFE	40	1	1	-
91	AVENIDA JOAQUIM RIBEIRO - IPUTINGA	UPA CAXANGÁ	IPUTINGA	RECIFE	19	-	3	-
92	AVENIDA DR. FRANCISCO CORREIA - 2009 - PIXETE	UPA SÃO LOURENÇO DA MATA	PIXETE	SÃO LOURENÇO DA MATA	41	-	1	-
93	ESTRADA DO FRIO - 1000 - JARDIM PAULISTA	UPA JARDIM PAULISTA	JARDIM PAULISTA	PAULISTA	86	-	1	-
94	AVENIDA VERIADOR OTACÍLIO AZEVEDO - NOVA DESCOBERTA	UPA NOVA DESCOBERTA	NOVA DESCOBERTA	RECIFE	58	-	-	-
95	AVENIDA MARECHAL MASCARENHAS DE MORAIS - 4223 - IMBIRIBEIRA	UPA IMBIRIBEIRA	IMBIRIBEIRA	RECIFE	97	-	7	-
96	RUA CRUZ ALTA - BARRA DE JANGADA	UPA BARRA DE JANGADA	BARRA DE JANGADA	JABOATÃO DOS GUARARAPES	15	-	-	-
97	PARQUE MEMORIAL ARCOVERDE - PARQUE 2 - SALGADINHO	ESPAÇO CIÊNCIA	SALGADINHO	OLINDA	36	-	5	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

					(Continuação)			
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
98	RUA DR. JOÃO LACERDA - CORDEIRO	DEPARTAMENTO DE HOMICÍDIOS E PROTEÇÃO A PESSOA	CORDEIRO	RECIFE	4	-	-	-
99	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	UFPE - DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	68	-	1	-
100	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	UFPE - DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	75	-	4	-
101	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	UFPE - BIBLIOTECA DO CCS	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	14	-	2	-
102	RUA ORFEU DO CARNAVAL - SANCHO	PRESÍDIO FREI DAMIÃO	SANCHO	RECIFE	24	-	2	-
103	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	UFPE- CENTRAL DE SEGURANÇA	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	21	-	1	-
104	PRAÇA DA REPÚBLICA - SANTO ANTÔNIO	PALÁCIO DO CAMPO DAS PRINCESAS	SANTO ANTÔNIO	RECIFE	151	3	7	-
105	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	IAM	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	72	-	1	-
106	RUA DONA MARIA AUGUSTA NOGUEIRA - 519 - BONGI	SECRETARIA DE SAÚDE	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	1	-	-	-
107	AVENIDA SÃO PAULO - 125 - JARDIM SÃO PAULO	RESIDÊNCIA	JARDIM SÃO PAULO	RECIFE	11	-	1	-
108	RUA ITÁ - 127B - JARDIM SÃO PAULO	RESIDÊNCIA	JARDIM SÃO PAULO	RECIFE	1	-	-	-
109	RUA TUPARETAMA - 75 - ESTÂNCIA	RESIDÊNCIA	ESTÂNCIA	RECIFE	3	-	2	-
110	RUA EPAMINONDAS - 91 - PAISSANDU	RESIDÊNCIA	PAISSANDU	RECIFE	14	-	-	-
111	RUA BULANDY - 104 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	1	-	-	-
112	RUA BULANDY - 84 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	6	-	-	-
113	RUA EDUARDO DUBEUX - 22 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	17	-	-	-
114	RUA EDUARDO DUBEUX - 24 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	12	-	-	-
115	RUA AMAZONAS, BLOCO - 116 - IPSEP	RESIDÊNCIA	IPSEP	RECIFE	2	-	-	-
116	RUA INÁCIO LEOPOLDO - 96 - IPUTINGA	RESIDÊNCIA	IPUTINGA	RECIFE	14	-	-	-
117	RUA FREI TITO DE ALENCAR LIMA - 14 - MACAXEIRA	RESIDÊNCIA	MACAXEIRA	RECIFE	2	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continuação)

COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
118	AV. JOSÉ AMÉRICO DE ALMEIDA - 110 - MACAXEIRA	RESIDÊNCIA	MACAXEIRA	RECIFE	1	-	-	-
119	RUA PROFESSOR LUIZ RODRIGUES DE MELO - 125 - MACAXEIRA	RESIDÊNCIA	MACAXEIRA	RECIFE	6	-	-	-
120	RUA WASSARANDUBA - 144 - APIPUCOS	RESIDÊNCIA	APIPUCOS	RECIFE	4	-	-	-
121	RUA LUMINOSA - 45B - ALTO JOSÉ BONIFÁCIO	RESIDÊNCIA	ALTO JOSÉ BONIFÁCIO	RECIFE	1	-	-	-
122	RUA PICUÍ - 466A - ALTO JOSÉ BONIFÁCIO	RESIDÊNCIA	ALTO JOSÉ BONIFÁCIO	RECIFE	6	-	-	-
123	RUA SÃO PAULO - 16 - IMBIRIBEIRA	RESIDÊNCIA	IMBIRIBEIRA	RECIFE	1	-	-	-
124	RUA CORONEL ALFREDO DUARTE - 526 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	6	-	-	-
125	RUA SÉRGIO GODOY DE VASCONCELOS - 22 - JARDIM ATLÂNTICO	RESIDÊNCIA	JARDIM ATLÂNTICO	OLINDA	4	-	-	-
126	RUA SÉRGIO GODOY DE VASCONCELOS - 34 - JARDIM ATLÂNTICO	RESIDÊNCIA	JARDIM ATLÂNTICO	OLINDA	4	-	-	-
127	RUA PROFESSOR OLÍMPIO MAGALHÃES - 05 - JARDIM ATLÂNTICO	RESIDÊNCIA	JARDIM ATLÂNTICO	OLINDA	4	-	-	-
128	RUA BARÃO DO CAPIBARIBE - 101 - DOIS IRMÃOS	RESIDÊNCIA	DOIS IRMÃOS	RECIFE	1	-	-	-
129	RUA BARÃO DO CAPIBARIBE - 115 - DOIS IRMÃOS	RESIDÊNCIA	DOIS IRMÃOS	RECIFE	21	-	-	-
130	RUA BARÃO DO CAPIBARIBE - 81 - DOIS IRMÃOS	RESIDÊNCIA	DOIS IRMÃOS	RECIFE	31	-	-	-
131	ESTRADA DO ARRAIAL - 4381 - TAMARINEIRA	RESIDÊNCIA	TAMARINEIRA	RECIFE	8	-	-	-
132	RUA AMELIOPOLIS - 118 - ALTO DO MANDU	RESIDÊNCIA	ALTO DO MANDU	RECIFE	2	-	-	-
133	RUA DR. TOMÉ DIAS - 137 - CASA AMARELA	RESIDÊNCIA	CASA AMARELA	RECIFE	1	-	-	-
134	RUA RIACHÃO - 26 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	1	-	-	-
135	RUA PROFESSOR COELHO DE ALMEIDA - 83 - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	3	-	-	-
136	RUA RIO CAPIBARIBE - 55 - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	1	-	-	-
137	RUA SÃO PUALO - 20 - CARMELITAS	RESIDÊNCIA	CARMELITAS	CAMARAGIBE	2	-	-	-
138	RUA VERTENTE - 35 - IPUTINGA	RESIDÊNCIA	IPUTINGA	RECIFE	4	-	1	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

					(Continuação)			
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
139	RUA SÃO MATHEUS - 23 - IPUTINGA	RESIDÊNCIA	IPUTINGA	RECIFE	9	-	-	-
140	RUA CÔNEGO LUIZ GONZAGA DO MONTE - 47 - IPUTINGA	RESIDÊNCIA	IPUTINGA	RECIFE	10	-	-	-
141	RUA ALTO ALEGRE - 53 - BOA VISTA	RESIDÊNCIA	BOA VISTA	RECIFE	6	-	-	-
142	RUA PARAÍBA - 205 - JARDIM BRASIL II	RESIDÊNCIA	JARDIM BRASIL II	OLINDA	22	-	-	-
143	RUA PEDRO BATISTA - 64 - DOIS UNIDOS	RESIDÊNCIA	DOIS UNIDOS	RECIFE	44	-	-	-
144	RUA PEDRO BATISTA - 66A - DOIS UNIDOS	RESIDÊNCIA	DOIS UNIDOS	RECIFE	2	-	-	-
145	RUA DURVAL - 08 - VASCO DA GAMA	RESIDÊNCIA	VASCO DA GAMA	RECIFE	3	-	-	-
146	RUA JÚLIO JOSÉ DE SOUZA - 178 - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	6	-	-	-
147	RUA ANITOPOLIS - 65B - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	13	-	-	-
148	RUA ARMANDO SORIANO - 170 - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	4	-	-	-
149	RUA ARMANDO SORIANO - 165 - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	5	-	-	-
150	RUA ARMANDO SORIANO - 158 - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	2	-	-	-
151	RUA BOM PASTOR - 1635 - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	2	-	-	-
152	RUA NOVA DESCOBERTA - 99 -	RESIDÊNCIA	NOVA DESCOBERTA	RECIFE	3	-	-	-
153	RUA JORNALISTA JORGE ABRANTES - 571 - JIQUIÁ	RESIDÊNCIA	JIQUIÁ	RECIFE	13	-	-	-
154	RUA CAMPO REDONDO - 20 - CAMPINA DO BARRETO	RESIDÊNCIA	CAMPINA DO BARRETO	RECIFE	11	-	-	-
155	RUA CAMPO REDONDO - 22 - CAMPINA DO BARRETO	RESIDÊNCIA	CAMPINA DO BARRETO	RECIFE	5	-	-	-
156	RUA GERINALDO ALVES - 92A - CAMPINA DO BARRETO	RESIDÊNCIA	CAMPINA DO BARRETO	RECIFE	8	-	-	-
157	RUA ITAINOPOLIS - 16 - CAMPINA DO BARRETO	RESIDÊNCIA	CAMPINA DO BARRETO	RECIFE	51	-	-	-
158	RUA BREJO DA MADRE DE DEUS - 64 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	25	-	-	-
159	RUA BREJO DA MADRE DE DEUS - 80 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	50	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

(Continuação)								
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
160	RUA BREJO DA MADRE DE DEUS - 100 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	10	-	-	-
161	RUA SÃO MIGUEL - 1412 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	14	-	-	-
162	RUA ALBERTO LUNDGREN - 2469 - JORDÃO BAIXO	RESIDÊNCIA	JORDÃO BAIXO	RECIFE	14	-	-	-
163	RUA ALBERTO LUNDGREN - 04 - JORDÃO BAIXO	RESIDÊNCIA	JORDÃO BAIXO	RECIFE	3	-	-	-
164	RUA JOSÉ ANTÔNIO DAS NEVES - 7450 - CANDEIAS	RESIDÊNCIA	CANDEIAS	JABOATÃO DOS GUARARAPES	11	-	-	-
165	RUA DO ESPINHEIRO - 685 - ESPINHEIRO	RESIDÊNCIA	ESPINHEIRO	RECIFE	16	-	-	-
166	RUA GOVERNADOR LEOPOLDO NEVES - 939 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	30	-	-	-
167	RUA GOVERNADOR LEOPOLDO NEVES - 941 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	96	-	-	-
168	RUA GOVERNADOR LEOPOLDO NEVES - 943 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	15	-	-	-
169	RUA GOVERNADOR LEOPOLDO NEVES - 1120 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	6	-	-	-
170	RUA GOVERNADOR LEOPOLDO NEVES - 2084 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	13	-	-	-
171	RUA GOVERNADOR LEOPOLDO NEVES - 938 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	4	-	-	-
172	RUA GOVERNADOR LEOPOLDO NEVES - 1120 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	2	-	-	-
173	RUA JÚLIO JOSÉ DE SOUZA - 156 - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	9	-	-	-
174	RUA JÚLIO JOSÉ DE SOUZA - 158 - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	7	-	-	-
175	RUA BOMBA DO HEMETÉRIO - 720 - BOMBA DO HEMETÉRIO	RESIDÊNCIA	BOMBA DO HEMETÉRIO	RECIFE	5	-	-	-
176	RUA BOMBA DO HEMETÉRIO - 726 - BOMBA DO HEMETÉRIO	RESIDÊNCIA	BOMBA DO HEMETÉRIO	RECIFE	7	-	-	-
177	ESTRADA VELHA DE ÁGUA FRIA - 1644 - CASA D - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	38	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

					(Continuação)			
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
178	ESTRADA VELHA DE ÁGUA FRIA - 1644 - CASA C - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	18	-	-	-
179	ESTRADA VELHA DE ÁGUA FRIA - 1644 - CASA B - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	17	-	-	-
180	SÍTIO DO PAI DE ADÃO - CASA 1 - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	103	-	-	-
181	RUA DA CARRAPETA - 200 - NOVA DESCOBERTA	RESIDÊNCIA	NOVA DESCOBERTA	RECIFE	10	-	-	-
182	RUA DEPUTADO GOMES DE SÁ - 06 - NOVA DESCOBERTA	RESIDÊNCIA	NOVA DESCOBERTA	RECIFE	3	-	-	-
183	RUA FRANCISCO PASOS - 240 - NOVA DESCOBERTA	RESIDÊNCIA	NOVA DESCOBERTA	RECIFE	5	-	-	-
184	RUA PRIMEIRA TRAVESSA MONSENHOR TEOBALDO ROCHA - 5802 - NOVA DESCOBERTA	RESIDÊNCIA	NOVA DESCOBERTA	RECIFE	12	-	-	-
185	RUA ARAGUANA - 52 - NOVA DESCOBERTA	RESIDÊNCIA	NOVA DESCOBERTA	RECIFE	8	-	-	-
186	RUA DOS TRABALHADORES - 90E - CAÇOTE	RESIDÊNCIA	CAÇOTE	RECIFE	8	-	-	-
187	RUA DOS TRABALHADORES - 85A - CAÇOTE	RESIDÊNCIA	CAÇOTE	RECIFE	9	-	-	-
188	RUA DOS TRABALHADORES - 100 - CAÇOTE	RESIDÊNCIA	CAÇOTE	RECIFE	11	-	-	-
189	RUA XIMBORE - 65 - CAÇOTE	RESIDÊNCIA	CAÇOTE	RECIFE	16	-	-	-
190	RUA XIMBORE - 65B - CAÇOTE	RESIDÊNCIA	CAÇOTE	RECIFE	3	-	-	-
191	RUA XIMBORE - 65D - CAÇOTE	RESIDÊNCIA	CAÇOTE	RECIFE	7	-	-	-
192	RUA AURELIANO QUINTAS - 67 - VÁRZEA	RESIDÊNCIA	VÁRZEA	RECIFE	6	-	-	-
193	RUA SANTO ANGELA - 11 - SAN MARTIN	RESIDÊNCIA	SAN MARTIN	RECIFE	2	-	-	-
194	RUA JOÃO LEITE - 668 - MANGUEIRA	RESIDÊNCIA	MANGUEIRA	RECIFE	23	-	-	-
195	RUA JOÃO LEITE - 676 - MANGUEIRA	RESIDÊNCIA	MANGUEIRA	RECIFE	3	-	-	-
196	AVENIDA MAURICIO DE NASSAU - 88 - IPUTINGA	RESIDÊNCIA	IPUTINGA	RECIFE	6	-	-	-
197	RUA SERIEMA - 34A - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	5	-	-	-
198	RUA SERIEMA - 34B - CORDEIRO	RESIDÊNCIA	CORDEIRO	RECIFE	4	-	-	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

									(Continuação)
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV	
199	RUA ROQUE PAES BARRETO - 15 - BREJO DA GUABIRABA	RESIDÊNCIA	BREJO DA GUABIRABA	RECIFE	2	-	-	-	
200	RUA MAJOR MARIO PORTELA - 523 - BONGI	RESIDÊNCIA	BONGI	RECIFE	17	-	-	-	
201	RUA LAURO DE SOUZA - 221 - CAMPO GRANDE	RESIDÊNCIA	CAMPO GRANDE	RECIFE	3	-	-	-	
202	RUA LAURO DE SOUZA - 30 - CAMPO GRANDE	RESIDÊNCIA	CAMPO GRANDE	RECIFE	5	-	-	-	
203	RUA EXPEDICIONÁRIO - 146 - CAMPINA DO BARRETO	RESIDÊNCIA	CAMPINA DO BARRETO	RECIFE	3	-	-	-	
204	RUA EXPEDICIONÁRIO - 23 - CAMPINA DO BARRETO	RESIDÊNCIA	CAMPINA DO BARRETO	RECIFE	4	-	-	-	
205	RUA DA BACIA - 219 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	42	-	-	-	
206	RUA DA BACIA - 220 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	5	-	-	-	
207	RUA PARANÁ D'OESTE - 233D - BEBERIBE	RESIDÊNCIA	BEBERIBE	RECIFE	16	-	-	-	
208	RUA PARANÁ D'OESTE - 233 - BEBERIBE	RESIDÊNCIA	BEBERIBE	RECIFE	9	-	-	-	
209	RUA SANTO AMARO - 44 - LINHA DO TIRO	RESIDÊNCIA	LINHA DO TIRO	RECIFE	12	-	-	-	
210	RUA SANTO AMARO - 55 - LINHA DO TIRO	RESIDÊNCIA	LINHA DO TIRO	RECIFE	15	-	-	-	
211	RUA BRANQUINHA - 70 - IPUTINGA	RESIDÊNCIA	IPUTINGA	RECIFE	11	-	1	-	
212	RUA BRANQUINHA - 15 - IPUTINGA	RESIDÊNCIA	IPUTINGA	RECIFE	3	-	-	-	
213	RUA DEMOSTENES DE OLINDA - 95A - MADALENA	RESIDÊNCIA	MADELENA	RECIFE	1	-	-	-	
214	RUA DO DESPACHO - 11 - AFOGADOS	RESIDÊNCIA	AFOGADOS	RECIFE	8	-	-	-	
215	RUA CONSELHEIRO PORTELA - 644 - ESPINHEIRO	RESIDÊNCIA	ESPINHEIRO	RECIFE	2	-	-	-	
216	RUA ANTÔNIO CARDOSO DA FONTE - 700 - IMBIRIBEIRA	RESIDÊNCIA	IMBIRIBEIRA	RECIFE	9	-	-	-	
217	RUA MONTE - 270 - ALTO JOSÉ DO PINHO	RESIDÊNCIA	ALTO JOSÉ DO PINHO	RECIFE	2	-	-	-	
218	RUA MONTE - 169 - ALTO JOSÉ DO PINHO	RESIDÊNCIA	ALTO JOSÉ DO PINHO	RECIFE	3	-	-	-	
219	RUA JOSEFA GOMES - 68D - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	26	-	2	-	
220	RUA MORAES E SILVA - 248 - ESTÂNCIA	RESIDÊNCIA	ESTÂNCIA	RECIFE	1	-	1	-	

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

					(Continuação)			
COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
221	RUA MARAJÓ - 180 - BEBERIBE	RESIDÊNCIA	BEBERIBE	RECIFE	12	-	-	-
222	RUA ACIOLE - 371 - ÁGUA FRIA	RESIDÊNCIA	ÁGUA FRIA	RECIFE	10	-	1	-
223	RUA LAURO DE SOUZA - 413 - CAMPO GRANDE	RESIDÊNCIA	CAMPO GRANDE	RECIFE	25	-	5	-
224	RUA 48 - 462 - ESPINHEIRO	RESIDÊNCIA	ESPINHEIRO	RECIFE	1	-	1	-
225	RUA AZÉBIO DE MATOS - 341 - JARDIM SÃO PAULO	RESIDÊNCIA	JARDIM SÃO PAULO	RECIFE	34	-	1	-
226	AVENIDA CAXANGÁ - 1378 - CAXANGÁ	RESIDÊNCIA	CAXANGÁ	RECIFE	5	-	-	-
227	RUA RAPOSO TAVARES - 144 - IBURA	RESIDÊNCIA	IBURA	RECIFE	1	-	-	-
228	RUA PARAQUE - 283 - BRASÍLIA TEIMOSA	RESIDÊNCIA	BRASÍLIA TEIMOSA	RECIFE	11	-	2	-
229	RUA AVEIRO - 65 - BREJO DA GUABIRABA	RESIDÊNCIA	BREJO DA GUABIRABA	RECIFE	23	-	1	-
230	RUA AVEIRO - 63 - BREJO DA GUABIRABA	RESIDÊNCIA	BREJO DA GUABIRABA	RECIFE	6	-	-	-
231	RUA FRANCISCO BELTRÃO - 43 - IBURA	RESIDÊNCIA	IBURA	RECIFE	25	2	-	-
232	RUA FRANCISCO BELTRÃO - 609 - IBURA	RESIDÊNCIA	IBURA	RECIFE	9	-	-	-
233	RUA VISCONDE DE GUARARAPES - 43 - DOIS UNIDOS	RESIDÊNCIA	DOIS UNIDOS	RECIFE	7	-	1	-
234	RUA JOSÉ DE VASCONCELOS - 83 - TAMARINEIRA	RESIDÊNCIA	TAMARINEIRA	RECIFE	7	-	1	-
235	RUA JOSÉ DE VASCONCELOS - 103 - TAMARINEIRA	RESIDÊNCIA	TAMARINEIRA	RECIFE	1	-	-	-
236	RUA JOAQUIM DA SILVA CALDAS - 90 - BONGI	RESIDÊNCIA	BONGI	RECIFE	19	-	2	-
237	AVENIDA MARECHAL MASCARENHAS DE MORAIS - 4223 - IMBIRIBEIRA	UPA IMBIRIBEIRA	IMBIRIBEIRA	RECIFE	107	1	3	-
238	AVENIDA JOAQUIM NABUCO - CIDADE TABAJARA	UPA OLINDA	CIDADE TABAJARA	OLINDA	82	-	7	-
239	PRAÇA DA REPÚBLICA - SANTO ANTÔNIO	PALÁCIO DO CAMPO DAS PRINCESAS	SANTO ANTÔNIO	RECIFE	26	-	2	-
240	ESTRADA DO FRIO - 1000 - JARDIM PAULISTA	UPA JARDIM PAULISTA	JARDIM PAULISTA	PAULISTA	161	-	4	-

**Tabela 1-** Descrição das coletas realizadas nos anos de 2015 e 2016 na Região Metropolitana de Recife.

COLETAS	ENDEREÇO	TIPO DE IMÓVEL	BAIRRO	CIDADE	Nº de Fêmeas	(Conclusão)		
						Pools + DENV	Pools + ZIKV	Pools + CHIKV
241	AVENIDA CONSELHEIRO ROSA E SILVA - 2130 - TAMARINEIRA	HOSPITAL ULISSES PERNAMBUCO	TAMARINEIRA	RECIFE	26	-	1	-
242	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - 1235 - CIDADE UNIVERSITÁRIA	HOSPITAL DAS CLÍNICAS	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	1406	-	22	4
243	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	UFPE - DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	5	-	-	-
244	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	UFPE - DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	3	-	-	-
245	AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO - CIDADE UNIVERSITÁRIA	UFPE - BIBLIOTECA DO CCS	CIDADE UNIVERSITÁRIA	RECIFE	3	-	-	-
246	RUA APRÍGIO GUIMARÃES - TEJIPIO	HOSPITAL OTÁVIO DE FREITAS	TEJIPIÓ	RECIFE	27	-	-	-
247	AVENIDA DR. FRANCISCO CORREIA - 2009 - PIXETE	UPA SÃO LOURENÇO DA MATA	PIXETE	SÃO LOURENÇO DA MATA	20	-	2	-
248	RUA LEONARDO DA VINCI - 68 - CURADO II	UPA CURADO	CURADO II	JABOATÃO DOS GUARARAPES	19	-	1	-
249	RUA DONA MARIA AUGUSTA NOGUEIRA - 519 - BONGI	SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE	BONGI	RECIFE	36	-	3	-
250	RUA VALÊ DO ITAJAÍ - IBURA	UPA IBURA	IBURA	RECIFE	8	-	2	-
251	RUA MIRABELA - 30 - TORRÕES	UPA TORRÕES	TORRÕES	RECIFE	8	-	1	-
252	AVENIDA JOAQUIM RIBEIRO - IPUTINGA	UPA CAXANGÁ	IPUTINGA	RECIFE	4	-	2	-
253	RUA CONDE D'EU - 177 - SANTO AMARO	RESIDÊNCIA	SANTO AMARO	RECIFE	22	-	1	-
254	RUA DR. TOMÉ DIAS - 137 - CASA AMARELA	RESIDÊNCIA	CASA AMARELA	RECIFE	2	-	1	-
255	RUA DO SOSSEGO - 179 - ARRUDA	RESIDÊNCIA	ARRUDA	RECIFE	4	-	1	-
256	AVENIDA GENERAL MANOEL RABELO - SUCUPIRA	RESIDÊNCIA	SUCUPIRA	JABOATÃO DOS GUARARAPES	8	-	1	-
TOTAL					6.227	19	194	6

Fonte: A autora.

## ANEXO A – Parecer do comitê de Ética



**Título do Projeto:** "Avaliação de dois Métodos de Coleta para Vigilância de Arbovirus em Mosquitos do Gênero Aedes e Culex".

**Pesquisador responsável:** Rosângela Maria Rodrigues Barbosa

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 17/11/2015

**Registro no CAAE:** 51012015.9.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** - 1.547.598

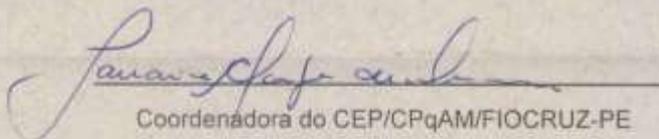
## PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de junho de 2016.

  
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Janaina Campos de Miranda,  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 454711  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
CEP 50.870-420 Fone: (81) 2104.2639  
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2039  
Recife - PE - Brasil  
comite.etica@cpqam.fiocruz.br

