

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE MEDICINA

HANID DE SOUSA VERSIANI

**Controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* com estações
de disseminação de piriproxifeno em São Sebastião, Distrito
Federal: quantidade de mosquitos e detecção de arbovírus**

Brasília, DF
2019

HANID DE SOUSA VERSIANI

Controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* com estações de disseminação de piriproxifeno em São Sebastião, Distrito Federal: quantidade de mosquitos e detecção de arbovírus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves

Brasília, DF

2019

HANID DE SOUSA VERSIANI

Controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* com estações de disseminação de piriproxifeno em São Sebastião, Distrito Federal: quantidade de mosquitos e detecção de arbovírus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Brasília, DF, 09 de agosto de 2019.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola Darvenne (Membro do programa)

Universidade de Brasília- UnB

Prof. Dr. Hugo Costa Paes (Membro externo)

Universidade de Brasília- UnB

Prof^a. Dr^a. Tatiana Karla dos Santos Borges (Membro suplente)

Universidade de Brasília- UnB

Dedico este trabalho à memória do meu avô João e minha avó Maria, que foram exemplos de caráter e dignidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que concedeu muitas bênçãos, ao longo da minha vida, e não somente nestes anos como mestranda, mas em todos os momentos. É o maior mestre que alguém pode conhecer!

À minha mãe Dinah, foi meu apoio nos momentos de angústia e que muitas vezes renunciou aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu. A senhora é meu maior exemplo, eu me espelho em ti, em tudo o que você já passou e mesmo assim continuou firme e forte. É uma mulher incrível, guerreira e tenho muito orgulho!

Às minhas irmãs Aryadne e Aryane, mesmo distantes são presentes em minha vida com palavras de apoio, companheirismo e incentivo. Nos momentos de angústia vocês me trazem alegria!

Ao meu esposo João e minha filha Maysa pelo amor, companheirismo, carinho, felicidade, compreensão, incentivo e dedicação. O tempo de convívio muitas vezes sacrificado para realização deste trabalho. Vocês sempre farão parte de cada vitória.

À prof^a. Dr^a. Nadjar Nitz, minha orientadora, por todas as orientações, ensinamentos, compreensão e incentivo transmitidos ao longo do desenvolvimento desse trabalho pela contribuição no meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço por ter confiado e acreditado no meu potencial e por todas as oportunidades que me deu. Você é uma das melhores pessoas que já conheci!

Ao prof. Dr. Rodrigo Gurgel, meu coorientador, pelas suas contribuições indispensáveis, confiança, conselhos que propiciaram um grande aprendizado, pela assistência, apoio e tempo dedicado durante este trabalho.

À todos os moradores de São Sebastião que colaboraram para a realização desse trabalho.

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Cassia, Danielle Marques, Zenilda Amorim, Bruna Caroline, Tamires Vital, Aline Moraes, Taís Milene, Moisés, Ester, Marcele, Nayra, Andressa, Jéssica, Laise, Rosinha e Tayane. Obrigada pelo companheirismo, apoio, disponibilidade em ajudar e auxiliar. Nossos almoços e café-terapia eram momentos de alegria e descontração.

Às minhas amigas, Ana Carolina e Geysa que me acompanham desde a faculdade. Obrigada pelo apoio, amor, carinho e amizade. Vocês são maravilhosas e especiais! Em especial, Luciene Guedes, pelo apoio, companheira, fiel, amiga e amorosa.

Às minhas amigas, Nicole Selleski e Fernanda Coutinho pela confiança e apoio. Vocês me ensinaram muito desde a época do estágio até o mestrado.

Aos professores Marcos Obara, Elisa Vianna, Mariana Hetch, Luciana Hagström-Bex e Fernando Abad pelo auxílio na execução e contribuição na qualificação desse trabalho.

Ao Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores e todos integrantes, onde foi o começo desta jornada. Em especial, Barbosa obrigada por toda dedicação e carinho com toda equipe em campo.

Às minhas amigas Renata Timbó e Luciana Freire, pelo apoio, incentivo, por escutar minhas reclamações, pelos puxões de orelha e conselhos. Amizade que começou no laboratório e será para a vida inteira.

À minhas amigas e companheiras Tauana Ferreira e Joana Ribeiro pelos momentos de descontração, amizade e convívio.

Aos meus amigos e companheiros de bancada, João Paulo, Taís Araújo, Vinícios Coelho e Lana Cristina, obrigada pelas horas e dias doados para a realização desse trabalho, pelo apoio, amizade e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos servidores da Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL) do DF pelo apoio no trabalho de campo, especialmente Israel Martins Moreira e Milton Lopes Coutinho.

A todos aqueles que contribuíram, direta e indiretamente, para a construção e conclusão desse trabalho.

"Entregue o teu caminho ao Senhor; confie nele, e Ele agir." (Salmos 37:5)

RESUMO

As arboviroses causadas pelos vírus dengue (DENV), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) são endêmicas no Brasil e o seu controle depende essencialmente do combate aos mosquitos transmissores. O emprego de estações de disseminação (EDs) de piriproxifeno (PPF), utilizando os próprios mosquitos para dispersão do produto, surge como uma alternativa para o controle desses vetores. Além disso, é importante conhecer a circulação desses arbovírus nos mosquitos para estabelecer estratégias de controle mais eficazes nas regiões endêmicas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi analisar o efeito de estações disseminadoras de PPF no controle de adultos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* e verificar a presença de arbovírus nos mosquitos coletados em São Sebastião, Distrito Federal. Na área de intervenção (AI) instalamos 150 EDs com PPF. A manutenção das EDs foi realizada mensalmente entre abril de 2017 e abril de 2018 e a coleta dos mosquitos foi realizada mensalmente, por aspiração, entre janeiro de 2017 e junho de 2018 na AI e na área controle (AC). Após as coletas, as fêmeas foram identificadas quanto a espécie e distribuídas em pools submetidos a extração de RNA total. A presença dos arbovírus ZIKV/DENV/CHIKV nos mosquitos foi verificada utilizando um kit *one step multiplex* RT-qPCR. Dos mosquitos aspirados, 832 foram identificados como *Ae. aegypti* e 3641 como *Cx. quinquefasciatus*. Houve redução significativa na quantidade de mosquitos na área de intervenção com EDs. A redução foi de 72,5% na quantidade de mosquitos na AI durante a intervenção, enquanto na AC houve um aumento de 7,6% no mesmo período. Especificamente, as capturas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* na AI diminuíram em 84,3% e 47,3%, respectivamente durante a instalação das EDs. Houve aumento na quantidade desses mosquitos nos períodos com maior precipitação em ambas as áreas de estudo. Ao analisar somente os dados dos meses chuvosos (para reduzir a influência de fatores climáticos na análise) também observou-se redução na quantidade desses mosquitos indicando que o efeito da intervenção com EDs foi relevante. Foram analisados 512 pools de fêmeas para detecção de DENV, ZIKV e CHIKV. A reação *multiplex* RT-qPCR foi positiva em 4 dos 192 pools de *Ae. aegypti* e em 58 dos 320 pools de *Cx. quinquefasciatus* capturados em São Sebastião- DF. Em 0,58% das amostras testadas foi verificada a presença simultânea dos vírus

DENV/ZIKV/CHIKV. Nossos resultados indicam que houve redução na quantidade de mosquitos na área de intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno, principalmente para *Ae. aegypti*. Os vírus DENV, ZIKV e CHIKV foram detectados pela primeira vez em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* no Distrito Federal e o método molecular sugere a co-circulação desses vírus nos mosquitos.

Palavras-chave: Arboviroses. *Aedes aegypti*. *Culex quinquefasciatus*. Piriproxifeno. RT-qPCR multiplex.

ABSTRACT

Dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) arboviruses are endemic in Brazil and their control depends mainly on the control of mosquito vectors. The use of pyriproxyfen (PPF) dissemination stations (DSs) using the mosquitoes themselves to spread the product appears as an alternative for controlling these vectors. In addition, it is important to know the circulation of these arboviruses in mosquitoes to establish more effective control measures in endemic regions. Thus, the objective of this study was analyze the effect of PPF dissemination stations on the control of adults of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and verify the presence of arboviruses in mosquitoes collected in São Sebastião, Federal District. In the intervention area (IA) we installed 150 DSs with PPF. DSs were maintained monthly between april 2017 and april 2018 and mosquitoes were collected monthly by aspiration between january 2017 and june 2018 in IA and in a control area (CA). After the catches, the females were classified by species and distributed in pools submitted to total RNA extraction. The presence of DENV/ZIKV/CHIKV arboviruses in mosquitoes was verified using a One-step multiplex RT-qPCR kit. Of the aspirated mosquitoes, 832 were identified as *Ae. aegypti* and 3641 as *Cx. quinquefasciatus*. There was a significant reduction in the number of mosquitoes in the IA with DSs; we observed a 72.5% reduction in the number of mosquitoes in IA during the intervention, while CA showed a 7.6% increase in the same period. Specifically, the catches of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* in IA decreased by 84.3% and 47.3% respectively during the installation of DSs. We observed an increase in the amount of these mosquitoes in the periods with higher precipitation in both study areas. When analyzing only the rainy months data (to reduce the influence of climatic factors on the analysis) we also observed a reduction in the amount of these mosquitoes indicating the relevant effect of the intervention with DSs. We analyzed 512 female pools for detection of DENV, ZIKV and CHIKV. The multiplex RT-qPCR reaction was positive in 4 of 192 *Ae. aegypti* pools and 58 of the 320 pools of *Cx. quinquefasciatus* caught in São Sebastião-DF. We verified that 0,58% of the tested samples were positive simultaneously by DENV/ZIKV/CHIKV viruses. Our results indicate that there was a reduction in the number of mosquitoes in the intervention area with pyriproxyfen dissemination stations, mainly for *Ae. aegypti*. DENV, ZIKV

and CHIKV viruses were first detected in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* in the Federal District and the molecular method suggests the co-circulation of these viruses in mosquitoes.

Keywords: Arboviruses. *Aedes aegypti*. *Culex quinquefasciatus*. Pyriproxyfen. multiplex RT-qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estimativa da distribuição geográfica de dengue, Zika e chikungunya. ...	19
Figura 2 - Barreiras que o arbovírus deve superar para infectar com sucesso o mosquito para futuramente transmiti-lo.	34
Figura 3 - Fases do ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	38
Figura 4 - Estágios do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> . A: Ovos; B: Pupa; C: Fêmea adulta demonstrando a "lira branca" no lado dorsal do tórax; D: Larva no 4º estágio.	39
Figura 5 - Estágios do ciclo de vida do <i>Culex quinquefasciatus</i> . A: Fêmea adulta ovipositando ovos em forma de jangada; B: Jangadas mostrando a corola no pólo anterior de cada ovo; C: Pupa; D: Larva.	42
Figura 6 - Principais diferenças entre os mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	43
Figura 7 - Representação da abordagem baseada na disseminação realizada pelos mosquitos (auto-disseminação) com estação disseminadora (ED) contendo análogo de hormônio juvenil (PPF). A ED com água atrai as fêmeas, que pousam sobre a superfície da estação aderindo em seu corpo as partículas do produto (círculo vermelho). As fêmeas contaminadas, saem da ED e transferem o PPF para criadouros que possuem as formas imaturas dos mosquitos (larvas e pupas).	50
Figura 8 - Delineamento experimental do estudo.	54
Figura 9 - Delimitação territorial da região administrativa de São Sebastião em relação a Brasília-DF.	55
Figura 10 - Região Administrativa XIV do Distrito Federal, São Sebastião mostrando organização das quadras e a localização de parques (verde).	56
Figura 11 - Imagem satélite da área de estudo em representação dos dois bairros de São Sebastião. Em vermelho o Residencial Oeste (Área de Intervenção-AI) e em verde o Residencial Bosque (Área controle-AC). A linha branca representa a distância de 2 Km entre as duas áreas.	57
Figura 12 - Imagem de satélite mostrando a distribuição espacial dos locais de captura de mosquitos com aspiradores elétricos em São Sebastião, DF. A: Residencial Bosque (Área controle-AC). B: Residencial Oeste (Área de intervenção-AI).	58
Figura 13 - Aspiradores elétricos de Nasci (Horst armadilhas). A: Aspirador elétrico grande; B: Aspirador elétrico pequeno desacoplado do copo/pote coletor; C: pote coletor com a tampa em funil invertido.	59
Figura 14 - Mesa refrigerada onde os mosquitos adultos foram identificados, separados e armazenados em microtubos com RNAlater®.	61
Figura 15 - Condições em que os ciclos da RT-qPCR foram realizadas.	64
Figura 16 - Imagem de satélite mostrando a distribuição espacial dos locais (amarelo) de instalação de Estações Disseminadoras de PPF no Residencial Oeste (Área de intervenção-AI) em São Sebastião, DF.	65

Figura 17 - Estação disseminadora (ED) com PPF usada como medida de intervenção para os mosquitos. A ED com água serve para atrair as fêmeas, o recipiente mais escuro e o tecido da cor preta, assemelha um local propício para a oviposição. As fêmeas pousam sobre o tecido com PPF, que subseqüentemente realizam a auto-disseminação, transferem o PPF para possíveis locais de reprodução.	66
Figura 18 - Número de mosquitos aspirados (<i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>) a cada 10 minutos de aspiração. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.	70
Figura 19 - Número de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> coletado a cada 10 minutos de aspiração. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.	71
Figura 20 - Número de mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> coletado a cada 10 minutos de aspiração. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.	72
Figura 21 - Número de mosquitos aspirados por mês (janeiro de 2017 a junho de 2018), a curva vermelha representa a área de intervenção e a curva verde representa a área controle. Os picos em azul indicam a precipitação acumulada dos meses em que foi realizada a aspiração. A: número total de mosquitos (<i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>) capturados; B: número de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> capturados; C: número de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> capturados.	73
Figura 22 - Precipitação mensal dos meses chuvosos, antes da intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2017) e durante a intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2018) com estações disseminadoras de piriproxifeno.	75
Figura 23 - Número de mosquitos aspirados nos meses chuvosos, antes da intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2017) e durante a intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2018) nas áreas estudo. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI. A: número total de mosquitos (<i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>) capturados; B: número de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> capturados; C: número de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> capturados.	76

Figura 24 - Resultados da RT-qPCR em tempo real das amostras de <i>Aedes aegypti</i> positivas para os vírus que causam dengue, Zika e chikungunya, controle interno de toda a reação (FAGO MS2) e o corante de referência passiva (MUSTANG PURPLE). A: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 11 positiva para ZIKV. B: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 79 positiva para DENV, ZIKV e CHIKV. C: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 145 positiva para DENV, ZIKV e CHIKV. D: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 179 positiva para DENV.	78
Tabela 1 - Distribuição dos pools de fêmeas <i>Aedes aegypti</i> positivos para os vírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados por mês e as áreas de estudo (Residencial Bosque-AC e Residencial Oeste-AI) em São Sebastião-DF, janeiro de 2017 a maio de 2018.	79
Figura 25 - Resultados da RT-qPCR em tempo real das amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> positivas para os vírus que causam dengue, Zika e chikungunya, controle interno de toda a reação (FAGO MS2) e o corante de referência passiva (MUSTANG PURPLE). A: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 415 positiva para DENV, ZIKV e CHIKV. B: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 516 positiva para DENV e ZIKV. C: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 448 positiva para ZIKV.	80
Tabela 2 - Distribuição dos pools de fêmeas <i>Culex quinquefasciatus</i> positivos para os vírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados por mês e as áreas de estudo (Residencial Bosque-AC e Residencial Oeste-AI) em São Sebastião-DF, janeiro de 2017 a maio de 2018.	81
Figura 26 - Distribuição da frequência de pools positivos de mosquitos para cada arbovírus.	82
Figura 27 - Distribuição da frequência de pools positivos de mosquitos para dois ou mais arbovírus.	83
Figura 28 - Proporção de pools positivos para arbovírus em relação ao total de pools testados. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.	84
Figura 29 - Proporção de pools positivos para arbovírus em relação ao total de pools testados nos períodos com e sem intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção e área controle em São Sebastião. O círculo preenchido indica a presença de piriproxifeno.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Área controle
ACE	Agentes de Combate a Endemias
AChE	Acetilcolinesterase
ACS	Agente Comunitário de Saúde
AHJ	Análogos do Hormônio Juvenil
AI	Área de Intervenção
Bti	<i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i>
CHIKV	Vírus Chikungunya
CL	Controle Legal
CT	Cycle Threshold
CV	Competência vetorial
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DENV	Vírus da Dengue
DF	Distrito Federal
DIVAL	Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECSA	East, Central, South African
EDs	Estações Disseminadoras
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional
FM	Faculdade de Medicina
FHD	Febre Hemorrágica de dengue
HJ	Hormônio Juvenil
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IGR	Insect Growth Regulator
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LACEN-DF	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
LAV	Vírus vivos atenuados
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde

ORF	Open Reading Frame
PAHO	Pan American Health Organization
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIE	Período de incubação extrínseco
PIV	Vírus inativado purificado
PNCD	Plano Nacional de Controle da Dengue
PPF	Piriproxifeno
RA	Região Administrativa
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa
SE	Semana Epidemiológica
SIT	<i>Sterile Insect Technique</i>
SVS/MS	Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
UnB	Universidade de Brasília
UBV	Ultra baixo volume
UFs	Unidades da Federação
VLP	Partículas semelhantes a vírus
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	DENGUE	19
1.2	ZIKA	25
1.3	CHIKUNGUNYA	27
1.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES.....	30
1.5	ARBOVÍRUS NOS VETORES	32
1.6	O VETOR <i>Aedes aegypti</i>	35
1.7	<i>Culex quinquefasciatus</i>	39
1.8	CONTROLE DE VETORES	43
1.9	JUSTIFICATIVA	51
2	OBJETIVOS	53
2.1	OBJETIVO GERAL.....	53
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	54
3.2	LOCAL DE ESTUDO.....	54
3.3	CAPTURA DOS MOSQUITOS.....	57
3.4	PREPARO DOS POOLS DE MOSQUITOS	61
3.4.1	Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	61
3.4.2	Fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	62
3.5	EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL	62
3.6	QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS	63
3.7	ANÁLISE POR RT-qPCR <i>MULTIPLEX</i>	63
3.8	INSTALAÇÃO DAS ESTAÇÕES DISSEMINADORAS COM PPF	64
3.9	ANÁLISE DE DADOS.....	67
3.9.1	Mosquitos aspirados.....	67
3.9.2	Positividade de arbovírus nos mosquitos	68
4	RESULTADOS	69
4.1	QUANTIDADE DE MOSQUITOS	69
4.2	DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS NOS MOSQUITOS	77
5	DISCUSSÃO	86
6	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
	Apêndice A - Termo para autorização para instalação de armadilhas e captura de mosquitos na área interna e externa da residência	122
	Apêndice B - Termo de autorização da instalação de potes para controle de mosquitos.....	123
	Apêndice C - Informativo aos participantes do projeto	124
	Apêndice D - Tabela com asmostras positivas.....	125

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, doenças infecciosas emergentes têm sido relatadas com maior frequência, constituindo ameaças constantes e relevantes em vários continentes, nos quais se apresentam sob forma epidêmica ou endêmica. Dentre essas doenças, destacam-se as arboviroses, causadas por um grupo de vírus denominado arbovírus. Esses vírus possuem uma ampla distribuição geográfica, englobando principalmente regiões tropicais e subtropicais, provavelmente por proporcionarem condições ecológicas mais favoráveis (CASSEB et al., 2013; FÉ et al., 2003).

Em 1942, o termo "*Arthropod-borne viruses*" foi adotado para descrever um grupo de vírus que infectavam animais, multiplicavam-se em artrópodes e estes os transmitiam a um hospedeiro vertebrado. Desde aquele momento, tal denominação incluía vírus pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, algumas vezes chegando a denominar vírus não transmitidos por artrópodes. Em 1963, o Subcomitê Internacional de Nomenclatura Viral, atual ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), orientou que o termo "arbovírus" fosse utilizado exclusivamente para os vírus que são transmitidos por artrópodes (WHO, 1985).

Entretanto, há alguns requisitos que definem arbovírus, como: infectar vertebrados e invertebrados, iniciando em um hospedeiro vertebrado uma viremia com duração e títulos suficientes para permitir infecção do vetor invertebrado e iniciar uma infecção produtiva; permanecer na glândula salivar do invertebrado com o propósito de fornecer vírus para a infecção de outros hospedeiros vertebrados e por meio da via transovariana ou venérea ser transmitido de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode (CASSEB et al., 2013; WHO, 1985).

A maioria dos arbovírus possui biologia muito complexa, por necessitarem de diversos hospedeiros para completar o ciclo de vida. As doenças causadas por esses vírus são transmitidas por vetores hematófagos, por exemplo mosquitos, carrapatos, moscas, entre outros. As espécies predominantes e potencialmente capazes de serem infectadas são as da família Culicidae, principalmente mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* (SUKHRALIA et al., 2018; LIANG, GAO & GOULD, 2015).

Há aproximadamente 550 espécies de arbovírus, das quais, mais de 150 estão associadas a doenças em seres humanos, sendo a maioria zoonótica (LOPES, NOZAWA & LINHARES, 2014). Atualmente, as espécies que pertencem às famílias Flaviviridae e Togaviridae, são as mais estudadas por causarem morbidade e mortalidade em humanos, além de serem transmitidas por mosquitos (FRANZ et al., 2015).

No ciclo humano-mosquito-humano, ainda que suas origens sejam zoonóticas, o principal hospedeiro para amplificar esses vírus são os seres humanos. Essa transmissão ocorre quando o mosquito antropofílico ingere sangue virêmico de um indivíduo, e transporta diretamente para outra pessoa (PATTERSON, SAMMON & GARG, 2016).

Os arbovírus possuem um grupo de RNA vírus que apresenta alta frequência de mutações e ampla plasticidade genética, o que possibilita adaptações a hospedeiros vertebrados e invertebrados em ambientes variáveis (COFFEY et al., 2013). A propagação desses vírus se desenvolveu em virtude de múltiplos fatores como o crescimento populacional, a facilidade de deslocamento dos indivíduos, mudanças climáticas e o insuficiente controle vetorial.

Muitos arbovírus estão reemergindo, entre esses destacam-se os vírus que causam dengue, Zika e chikungunya. Recentemente, essas arboviroses estiveram relacionadas a grandes epidemias que se tornaram endêmicas e se expandiram geograficamente (Figura 1). Estas geram alta viremia em seres humanos, o suficiente para proporcionar grandes surtos de infecção, principalmente em áreas urbanas (PATTERSON, SAMMON & GARG, 2016; FREEMAN et al., 2018).

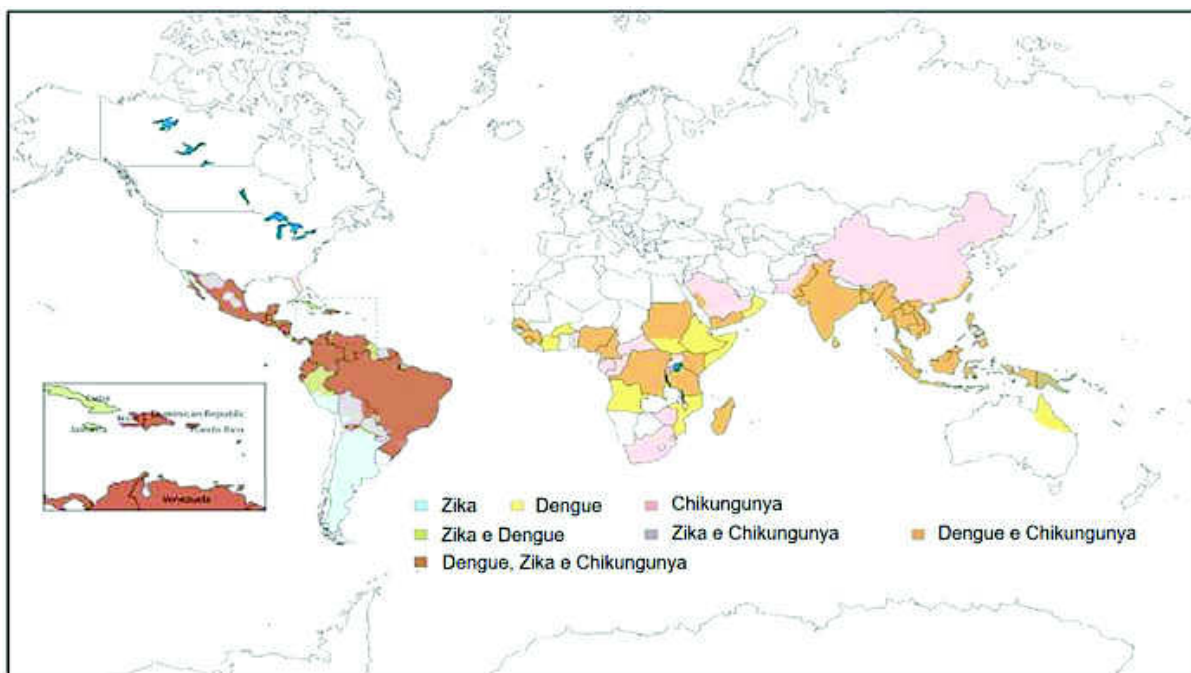


Figura 1 - Estimativa da distribuição geográfica de dengue, Zika e chikungunya.

Fonte: Adaptado de Patterson, Sammon e Garg (2016).

A incidência das infecções por arbovírus e a quantidade de seus vetores aumentam proporcional e gradativamente (FIGUEIREDO, 2015). Os mosquitos do gênero *Aedes*, especificamente *Aedes aegypti*, tem sido considerado o vetor mais eficaz para a propagação destas doenças, particularmente em ambientes urbanizados (WANG et al., 2000).

Em estudo realizado em 2016, Ayres sugere que pernilongos do gênero *Culex*, mosquitos domésticos tropicais e frequentemente observados no Brasil, possivelmente sejam capazes de transmitir Zika, havendo ainda outras infecções arbovirais reconhecidamente transmitidas por várias espécies de *Culex* (AYRES, 2016).

1.1 DENGUE

A dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus membro do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. O vírus da dengue (DENV) apresenta cinco sorotipos geneticamente e antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3, -4 e -5) e são os arbovírus humanos mais importantes na atualidade (NORMILE, 2013; MOTA et al., 2016). É composto por uma fita única de ácido ribonucléico de cadeia simples e

sentido positivo (+ssRNA), revestida por um envelope de proteína em formato icosaédrico. O genoma é baseado numa única ORF longa (Open Reading frame - Fase Aberta de Leitura), com mais de 10.000 nucleotídeos, codificando todas as proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope (E), pré membrana (prM/M) que se apresentam na extremidade aminoterminal, e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, que se encontram na extremidade carboxila e estão correlacionadas com a replicação viral (KING et al., 2011).

A dengue apresenta amplo espectro clínico, contendo desde formas oligossintomáticas até quadros graves, podendo evoluir para óbito (BRASIL, 2016a; WHO, 2009). A dengue clássica é uma doença febril aguda, com duração de 5 a 7 dias com início repentino. Possui o quadro clínico muito variável e os sintomas mais frequentes são cefaleia e dor muscular generalizada, articular e óssea. Casualmente, fotofobia; uma erupção cutânea maculopapular leve; dor retro-orbital; e pequenas manifestações hemorrágicas, como petéquias, equimoses, epistaxe e teste de fragilidade capilar positivo (BRASIL, 2016a; BURATTINI et al., 2016).

Os sinais de alarme, que sugerem perda plasmática e a iminência de choque, podem ocorrer entre o terceiro e o sétimo dia, quando frequentemente tende a cessar a febre. Outros sintomas são vômitos persistentes, dor abdominal intensa e contínua, hepatomegalia dolorosa, desconforto respiratório, sonolência ou irritabilidade excessiva, hipotermia, sangramento de mucosas, diminuição da sudorese e derrames pleural, pericárdico e ascite (sinais de extravasamento de plasma por alteração endotelial). A identificação desses sintomas permite o reconhecimento precoce da evolução para formas graves da doença melhora o prognóstico e evita maiores complicações, como óbito (BRASIL, 2016a).

Alguns pacientes progridem para a doença nas formas mais graves, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular com ou sem hemorragia. O extravasamento de plasma grave pode levar ao choque com acúmulo de líquido em cavidades e dificuldade respiratória; podendo ocorrer sangramento grave de mucosas e comprometimento de órgãos. Em geral, iniciam no momento em que os níveis virais estão diminuindo, indicando provável doença imunomediada. Os pacientes com síndrome do choque da dengue inicialmente sofrem de vazamento

capilar assintomático progredindo do choque compensado para o choque hipotensivo, levando eventualmente à parada cardiorrespiratória. Portanto, devem ser monitorados de perto, pois poucas horas podem separar o choque hipotensivo, o colapso cardiorrespiratório e a parada cardíaca (MULLER, DEPELSENAIRE & YOUNG, 2017).

Os primeiros relatos sobre uma doença clinicamente parecida com a dengue foram descritos em uma enciclopédia chinesa, durante a Dinastia Chin (265 a 420 d.C.). Os chineses denominavam essa doença como "veneno da água", por associaram a insetos voadores relacionados a água. Relatos seguintes sugerem que surtos que ocorreram em 1635 nas Antilhas Francesas e depois em 1699 no Panamá supostamente poderiam ser dengue (GUBLER, 1998).

Em 1788, ocorreu provavelmente pela primeira vez, uma pandemia com ampla distribuição geográfica de uma doença similar a dengue, em vários locais: Jacarta, na época era Batavia, Cairo, Sevilha, Cádiz e Espanha. Em seguida, houve outro registro que sugere uma segunda pandemia, entre 1823 a 1916, quando essa arbovirose cruzou o mundo da África para Índia, Oceania e chegando às Américas, por meio da expansão do comércio. Entretanto, no início da Segunda Guerra Mundial, devido a diversas mudanças epidemiológicas, ecológicas e demográficas iniciou-se uma nova relação entre a doença, os seres humanos, e concomitantemente seu principal vetor, *Aedes aegypti*. Após a Guerra, uma ampla e descontrolada urbanização com habitações, esgotos, gestão de resíduos e distribuição de água inapropriados, contribuíram para a dispersão do vírus e o aumento da densidade do vetor, facilitando a disseminação em várias regiões globais. Assim, contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas científicas com o objetivo de estudar a doença, seu agente etiológico e o desenvolvimento de testes sorológicos (WEAVER & VASILAKIS, 2009; GUBLER, 2002).

Como consequência dessas mudanças houve um aumento notável da propagação da dengue, hiperendemicidade e o surgimento da febre hemorrágica de dengue (FHD) ou dengue grave. Em 1950, houve o primeiro relato de uma epidemia de dengue grave no Sudeste Asiático, e após 25 anos essas epidemias ocorreram em vários países sendo uma das principais razões de hospitalização e morte de crianças (GUBLER & CLARK, 1995).

No Brasil, a primeira epidemia registrada de dengue (pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4) foi em 1982 em Boa Vista-RO (RAMALHO et al., 2018), possivelmente introduzidas no Brasil por via terrestre a partir de países do norte da América do Sul, pela fronteira da Venezuela e Caribe (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Em 1986, uma nova epidemia ocorreu no Rio de Janeiro (sorotipo DENV-1) que se dispersou para outros estados. Em Nova Iguaçu-RJ (1990) houve mais casos desse sorotipo e introdução do sorotipo DENV-2 e, conseqüentemente surgiram os primeiros casos de dengue grave no país (TEIXEIRA & BARRETO, 1996). Em 2000, foi isolado pela primeira vez o sorotipo DENV-3 no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 2005).

Atualmente, estima-se que ocorra anualmente entre 50 a 100 milhões casos de dengue, dentre estes 500.000 evoluem para dengue grave e 22.000 para óbito, especialmente entre crianças. Em 2010, foram relatados 2,2 milhões de casos e aumentou para 3,2 milhões em 2015, apresentando endemicidade em no mínimo 100 países da Ásia, Pacífico, Américas, África e Caribe (WHO, 2018; CDC, 2014).

Nos últimos anos os casos de dengue se expandiram rapidamente pelo mundo. Porém, o número de casos é subnotificado, dos quais muitos casos podem ser classificados inadequadamente. Um estudo realizado em 2013, apresentou uma estimativa de 390 milhões infecções por dengue por ano, sendo que 96 milhões podem apresentar manifestações clínicas seja qual for a gravidade (WHO, 2018; BHATT et al., 2013). E cerca de 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, podem adquirir dengue (BRADY et al., 2012; WHO, 2018).

No decorrer do período de 2011-2017, nas Américas, surtos de dengue ocorreram logo após alguns eventos esportivos com grande movimento de pessoas: em 2011 no México (Jogos Pan-Americanos em Guadalajara) e 3 eventos no Brasil em 2013 (Copa das Confederações), 2014 (Copa do Mundo) e 2016 (Olimpíadas). Dessa forma, notou-se o aumento da taxa de mortalidade da dengue nesse continente ao longo desses anos (SALLES et al., 2018; PAHO, 2018b).

Nesse mesmo período, destaca-se o aumento de aproximadamente 30% no número de casos de dengue em comparação com os anos anteriores (2001-2010). Os últimos sete anos contribuíram com 47% do número total de casos, quando comparado com as décadas anteriores. Os dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) nas Américas demonstraram que as taxas de mortalidade foram

significativas nos últimos dez anos (2007-2017) (PAHO, 2018^a; PAHO, 2018b; SALLES et al., 2018).

No Brasil, no período de 2011-2017 foram registrados mais 6 milhões de casos prováveis de dengue, dos quais se destacaram os anos 2013 (1.438.331 casos, 709,2/100 mil habitantes), 2015 (1.688.688 casos, 801,2/100 mil habitantes) e 2016 (1.478.955 casos, 717,7/100 mil habitantes) (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2016a; BRASIL, 2017a; PAHO, 2018a). De acordo com os boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde (MS), no Brasil em 2018, até a semana epidemiológica (SE) 42 (31/12/2017 a 20/10/2018), foram registrados 218.337 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 105,1/100 mil habitantes. O Centro-Oeste apresentou 79.223 casos prováveis, sendo a região com maior número de casos prováveis, 36,2% em relação ao total do país (BRASIL, 2018c).

Devido à expansão e aumento de casos da dengue em 1997, a Organização Mundial da Saúde publicou um guia (Segunda edição: Dengue hemorrágica: diagnóstico, tratamento, prevenção e controle) com a finalidade de auxiliar profissionais da saúde e outros sobre a dengue. Entretanto, houve aumento nos casos de dengue pelo mundo, inclusive em muitas áreas anteriormente não afetadas e uma nova edição foi produzida em 2009 (WHO, 2009). No entanto, baseado nos resultados de um estudo, foi proposto incorporar às novas diretrizes da OMS dois tópicos para a classificação: Dengue e dengue grave (ALEXANDER et al., 2011).

No Brasil, com o aumento da frequência de casos clínicos complicados da dengue, consequentemente com alta morbidade e aumento das hospitalizações, o guia com critérios para dengue da OMS deixou de atender a realidade epidemiológica do Brasil. Com isso, o MS propôs um novo guia (BURATTINI et al., 2016). Este possui diretrizes orientando a lidar com casos de dengue, desde os casos primários em saúde até os de maior complexidade. Diante disso, utilizando classificação de risco (grupo A, B, C e D) de acordo com os sinais e sintomas, com o principal propósito de evitar óbitos por dengue (BRASIL, 2016a).

Atualmente, não existe terapia antiviral específica para a infecção causada pelo DENV, o tratamento embasa-se em orientações fornecidas pelas diretrizes da região ou pela OMS (KULARATNE, 2015). Assim sendo, é indicado pelas diretrizes do MS, o tratamento para aqueles que não apresentam sinais de alarme (grupo A e

B): como hidratação oral apropriada, repouso e paracetamol; caso os pacientes apresentem algum sinal de alarme (grupo C), é orientado iniciar imediatamente a reposição volêmica e a internação com monitoramento (mínimo de 48 horas) até a estabilização. Nos casos mais graves (presença de sinais de choque, sangramento ou disfunção grave de órgãos) é necessário a reposição volêmica (crianças ou adultos), imediatamente antes de iniciar fase de expansão rápida parental; além disso, é importante nesses casos a constante observação (mínimo de 48 horas) até estabilizar (BRASIL, 2016a).

Nos últimos anos, diversos esforços foram realizados, tanto nacionais quanto internacionais para providenciar uma vacina adequada contra dengue. A grande dificuldade para a produção da vacina era que fosse capaz de conceder imunidade para os cinco sorotipos. Acredita-se que em indivíduos que recuperam de infecção por um sorotipo DENV (infecção primária) há o risco de desenvolver as formas mais agressivas da dengue se posteriormente forem infectados por outro sorotipo (infecção secundária) (ALWIS et al., 2011; FARES et al., 2015).

Recentemente, uma vacina tetravalente, recombinante e atenuada, a Dengvaxia® da Sanofi-Pasteur (CYD-TDV) tornou-se primeira vacina licenciada contra a dengue. Todos os sorotipos que a compõem são originados por tecnologia de recombinação e associado ao vírus atenuado da Febre Amarela (17D204). A comercialização foi liberada em vários países da Ásia e da América Latina, inclusive o Brasil, e é indicada para indivíduos com idades entre 9 e 45 anos que vivem em áreas endêmicas (WICHMANN et al., 2017; WHO, 2018b).

De acordo com Halstead e Russel (2016), a CYD-TDV confere risco a indivíduos soronegativos vacinados de desenvolver a forma grave da doença ou hospitalizar após infecção natural, quando comparados indivíduos soropositivos vacinados (HALSTEAD & RUSSELL, 2016). A OMS recomenda que a vacinação seja apenas em indivíduos soropositivos. Para evitar o aumento de resultados falso-positivos nos testes sorológicos de indivíduos vacinados, o teste de diagnóstico de uma infecção aguda causada por dengue orienta sempre que possível a confirmação viral, por exemplo a realização da PCR (Reação em cadeia da polimerase) (WHO, 2018b). Atualmente, há outras vacinas tetravalentes, recombinantes e atenuadas (TV003/TV005 e TDV) em desenvolvimento clínico que

encontram-se na fase 3 (WHITEHEAD, 2015; OSORIO, WALLACE & STINCHCOMB, 2016).

1.2 ZIKA

A doença Zika é causada pelo vírus Zika (ZIKV) e sua estrutura é semelhante à de outros flavivírus, como o vírus da dengue. Possui o genoma de RNA de sentido positivo, de fita única, revestida por envelope de proteína com formato icosaédrico. Seu genoma é composto por uma única ORF longa, codificando três proteínas estruturais (C, E e prM/M) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (KING et al., 2011; WHITE et al., 2016). O ZIKV possui diversidade filogenética, sendo as principais linhagens da África Oriental, África Ocidental e Ásia (SHRIVASTAVA et al., 2018).

Muitas pessoas infectadas por esse vírus não apresentam manifestações clínicas. Os sintomáticos relatam principalmente cefaleia moderada, hipertrofia ganglionar, erupção cutânea, febre, artralgia e conjuntivite. Acometimento neurológico é raro. A infecção é autolimitada, geralmente sua ocorrência não persiste por mais de uma semana (WHO, 2016b; IGBINOSA et al., 2017; REID, RIMMER & THAKUR, 2018).

O grupo mais afetado pelo ZIKV é o das gestantes, no qual o vírus pode causar microcefalia no feto, comprometendo desenvolvimento normal do cérebro. As consequências a longo prazo são variáveis, desde anomalias cerebrais leves até casos mais graves como paralisia cerebral (CDC, 2016; DRIGGERS et al., 2016).

Apesar de serem raras, há muitas complicações neurológicas graves que estão relacionadas à infecção por ZIKV em adultos e adolescentes. A síndrome de Guillain-Barré, que causa paralisia flácida generalizada, tornou-se a complicação neurológica mais comum correlacionada ao ZIKV nesses grupos (REID, RIMMER & THAKUR, 2018).

Em 1947, foi realizado o primeiro isolamento do vírus a partir do soro de um macaco *Rhesus* capturado na Floresta Zika (Uganda). E em 1948, o segundo isolamento foi feito a partir de número considerável de *Aedes africanus*, capturados na mesma floresta. Portanto, o vírus foi denominado de vírus Zika pela localidade de onde os vírus foram encontrados (DICK, KITCHEN & HADDOW, 1952).

Acredita-se que a infecção por ZIKV em humanos foi relatada pela primeira vez em 1953 na Uganda e na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Em seguida, dados sorológicos e entomológicos demonstraram infecções por ZIKV no continente africano entre 1969 a 1999 na Nigéria, Serra Leoa, Gabão, Uganda, República Centro-Africana, Senegal e na Costa do Marfim. Na Ásia foram relatadas no Paquistão, Malásia, Indonésia (1977 e 1978), Micronésia (2007) e Camboja (2010) (MUSSO & GUBLER, 2016).

Apesar da reemergência do ZIKV ter acontecido repetidamente e em vários países, somente 14 casos em humanos foram informados antes de abril de 2007. No mesmo ano, relatou-se pela primeira vez uma epidemia do ZIKV, com casos confirmados e com evidências sorológicas, na ilha de Yap, na Micronésia (FAYE et al., 2014). Em 2013 e 2014, aconteceu um surto ainda maior do ZIKV na Polinésia Francesa. Até então, não havia registro nesse país de um grande surto e também era o primeiro causado por outro arbovírus que não fosse o DENV. Realizaram análise filogenética da sequência da cepa do ZIKV, demonstrando que esta era geneticamente parecida com a cepa isolada no Camboja em 2010 (CAO-LORMEAU et al., 2014).

Posteriormente, outros surtos foram descritos em regiões vizinhas no Oceano Pacífico Sul, incluindo na Nova Caledônia, nas Ilhas Cook e na Ilha de Páscoa (MUSSO, NILLES & CAO-LORMEAU, 2014; MUSSO, CAO-LORMEAU & GUBLER, 2015). No mesmo período (2013-2014), espalhou-se para países mais distantes como Japão (KUTSUNA et al., 2014), Austrália (PYKE et al., 2014), Noruega (ZAVALA-CASTRO et al., 2014) e Itália (ZAMMARCHI et al., 2015).

Em 2014, foi confirmado pela primeira vez a circulação autóctone do ZIKV nas Américas, especificamente no Chile (Ilha de Páscoa) (TOGNARELLI et al., 2016). No ano de 2015, foram relatados casos de ZIKV no Brasil (ZANLUCA et al., 2015; CAMPOS, BANDEIRA & SARDI, 2015). Desde então, o vírus dissipou-se rapidamente para outros países da América do Sul e Central e do Caribe. Concomitantemente, houve um aumento rápido dos casos de recém-nascidos com microcefalia. Devido a rápida dispersão do vírus pelas Américas, simultaneamente com a associação com a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré, a OMS

declarou estado de emergência de saúde pública internacional (SAMPATHKUMAR & SANCHEZ, 2016; WHO, 2016a).

No Brasil, foram registrados 215.319 casos prováveis de Zika em 2016 (105,3 casos/100 mil habitantes); em 2017 um número menor de casos prováveis foi registrado (17.338, 8,4 casos/100 mil habitantes). Nesses dois anos, a região que apresentou maior da taxa de incidência de casos prováveis foi o Centro-Oeste com taxa de incidência de 222,0 casos/100 mil habitantes e 38,8 casos/100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b). De acordo com os Boletins epidemiológicos, até a SE 44 de 2018, 7.544 casos prováveis de doença pelo vírus Zika foram registrados, com taxa de incidência de 3,6 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2018b).

Na África, a transmissão do ZIKV acontece por meio de um ciclo silvestre, incluindo especialmente vetores do gênero *Aedes* e primatas não humanos, no qual os humanos eram hospedeiros eventuais. Com a expansão desse arbovírus na área urbana, o ciclo *Aedes*-humano-*Aedes*, parecido com o da dengue, tornou-se frequentemente relatado (BARONTI et al., 2014).

Como outros flavivírus, o RNA do ZIKV foi encontrado em fluidos corporais humanos como: sangue, urina, sêmen, saliva, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, leite materno, placenta e tecido cerebral, possibilitando o mecanismo de transmissão não vetorial. O período de incubação da infecção do ZIKV é em torno de 7 dias com variação de 3 a 10 dias (MUSSO et al., 2014; MUSSO et al., 2015; GOURINAT et al., 2015; NORONHA et al., 2016; BASILE, KOK & DWYER, 2017; GIOVANETTI et al., 2018).

O tratamento é direcionado para aliviar os sintomas, principalmente para controlar a febre, as dores da artrite e as erupções. Atualmente, não há vacinas aprovadas ou terapias específicas para combater a infecção causada pelo ZIKV. No entanto, existem algumas vacinas em desenvolvimento e com avanços em estudos clínicos, incluindo vírus inativado purificado (PIV), vírus vivos atenuados (LAV), partículas semelhantes a vírus (VLP), DNA, RNA modificado, vetores virais e vacinas de subunidades (BASILE, KOK & DWYER, 2017; GARG, MEHMETOGLU-GURBUZ & JOSHI, 2018).

1.3 CHIKUNGUNYA

A febre chikungunya é causada por um vírus membro do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*. O vírus chikungunya (CHIKV) é envelopado, com formato esférico e capsídeo icosaédrico. Seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA (ssRNA), linear e sentido positivo. Possui estrutura genômica baseado em duas fases de leitura abertas (ORFs) que codificam as cinco proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope (E1, E2, E3), 6k e quatro proteínas não estruturais (1:nsP1; 2:nsP2; 3:nsP3; 4:nsP4) (KHAN et al., 2002; MASCARENHAS et al., (2018).

Foram identificados das cepas do CHIKV três genótipos: o asiático; o leste, centro, sul-africano (*ECSA-East, Central, South African*) e o oeste africano. O genótipo ECSA ou Cosmopolitan foi o motivo do reaparecimento do CHIKV nos continentes asiático e africano. E recentemente o genótipo asiático foi o responsável pelos surtos ocorridos no Caribe e em algumas regiões da América (VOLK et al., 2010; ABRAHAM et al., 2016).

O nome Chikungunya origina-se de um linguajar local que significa “aquilo que se curva”, referente à aparência encurvada que vários indivíduos apresentam como consequência da inflamação dolorosa das articulações geralmente relacionadas à doença (SCHUFFENECKER et al., 2006). Os demais sintomas são: febre alta, mialgia, cefaleias, exantema e artralgia. Porém, essa última manifestação regularmente frequente, geralmente afeta várias articulações. O período de incubação desta doença varia de 1 a 12 dias. Apesar das manifestações clínicas agudas não persistirem mais de uma ou até duas semanas, a artralgia pode permanecer por meses ou até anos. E as manifestações clínicas assintomáticas variam de 3% a 25% dos casos (PINHEIRO et al., 2016).

A chikungunya apresenta espectro clínico variado, resultado da capacidade do vírus de reprodução em diversos tecidos. Sendo assim, as manifestações clínicas atípicas têm sido descritas com periodicidade em locais de surtos e epidemias, que compreendem alterações neurológicas, renais, cardíacas e oculares, com maior frequência em pacientes a partir de 65 anos e com doenças preexistentes, podendo levar complicações e a óbito. Contudo, a maioria dos indivíduos consegue se recuperar da infecção. As complicações neurológicas manifestam-se semelhantemente em crianças e adultos, e incluem encefalites, mieloneuropatia,

Síndrome de Guillain-Barré, neuropatias e paralisia flácida (AZEVEDO, OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2015; PINHEIRO et al., 2016).

As primeiras descrições de uma doença parecida com a chikungunya ocorreram em 1823, em Zanzibar, denominada pelos moradores locais como *kidinga pepo* (doença caracterizada por uma convulsão imediata). Alguns anos depois no mesmo local, uma epidemia dessa doença ocorreu e foi descrita pelo *British Medical Journal*. Em 1827 e 1828, uma doença similar foi relatada no Caribe, posteriormente, Nova Orleans, Louisiana e parte da Carolina do Sul nos Estados Unidos. Acredita-se que a doença foi importada para Havana, Cuba, por escravos provenientes da África (HALSTEAD, 2015; YACTAYO et al., 2016).

Em 1950, o CHIKV tornou-se conhecido ao ser isolado na Tanzânia. Em 1954, a presença desse vírus foi confirmada na Ásia, Filipinas e, em seguida, em outros países, como Índia, Tailândia e Paquistão. Casos aleatórios e surtos menores foram notificados. Contudo, o CHIKV reapareceu em 2005, causando vários surtos em humanos na África, Ásia e ilhas do Oceano Índico. Presume-se que essa reemergência seja resultado da adaptação genética do vírus aos vetores da região (TAUIL, 2014; DONALISIO & FREITAS, 2015).

Em 2007, ocorreu um grande surto, de certa forma inesperado, em duas aldeias vizinhas na Itália (REZZA et al., 2007). Em 2010, foi relatado transmissão autóctone do CHIKV no sudeste da França. Realizaram análise sequencial dos genomas dos vírus isolados na região e de isolados de regiões estrangeiras que sugeriu o potencial do vírus em adaptar-se em diversos ambientes, resultando assim sua disseminação pela Europa (GRANDADAM et al., 2011).

Desde esse momento, a dispersão desse arbovírus foi descrita no sul da China, península arábica e Nova Caledônia no Oceano Pacífico e em 2011, sua inserção foi observada nas ilhas do Pacífico. O CHIKV dissipou rapidamente e em 2013, foi relatado o primeiro caso de infecção autóctone nas Américas (Ilha Saint Martin). Até 2015, mais de 1 milhão de casos suspeitos de CHIKV foram registrados em 47 países ou territórios da América do Norte e do Sul, incluindo casos autóctones notificados na Bolívia, Colômbia, Brasil, Paraguai, Venezuela e Equador. Em 2017, este vírus foi descrito em mais de 100 países e territórios na África, Ásia, Américas e Europa (CUNHA & TRINTA, 2017; AN et al., 2017).

Os primeiros casos de infecção por CHIKV no Brasil foram informados em 2014 no Norte, especificamente em Oiapoque/AP, e em Feira de Santana, no Nordeste, na Bahia. No ano seguinte (2015), a epidemia se dispersou para outros estados do Nordeste (BRITO, 2017). Em 2015, foram notificados 38.499 casos, e em 2016, até a 52ª SE, havia 271.824 casos registrados em todo o país (BRASIL, 2017b) Em 2017, 185.593 casos prováveis de febre de chikungunya no país foram registrados e até a SE 49 de 2018 (31/12/2017 a 10/12/2018) esse número diminuiu para 85.221 casos prováveis com incidência de 40,9 casos/100 mil habitantes a maioria na região Sudeste do país. O Centro-Oeste, foi a segunda região com maior número de notificações, com 13.761 (16,7%) casos suspeitos (BRASIL, 2018a,d).

Atualmente, não há fármaco aprovado para limitar a replicação do CHIKV e melhorar as manifestações clínicas. O tratamento disponível consiste somente em terapias antipiréticas e antálgicas para amenizar os sintomas da doença. O favipiravir, assim como a ribavirina e o interferon, mostraram atividade antiviral *in vitro*, mas ainda estão sendo avaliadas em ensaios clínicos (WEAVER & LECUIT, 2015). Encontram-se em desenvolvimento clínico e pré-clínico várias vacinas candidatas a chikungunya. Cada uma consiste em estratégias e estágios de desenvolvimento diferentes, que incluem partículas semelhantes a vírus (VLPs), vacinas vetorizadas/quiméricas, vacinas de subunidades, vacinas vivas atenuadas e vacinas de ácido nucleico (ERASMUS, ROSSI & WEAVER, 2016).

1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES

Determinar o diagnóstico de arboviroses somente por meio da avaliação clínica não é confiável, pois pode-se confundir os sintomas. Diante disso, o diagnóstico necessita de testes laboratoriais para confirmar a etiologia dessas doenças (CDC, 2016).

O diagnóstico laboratorial das arboviroses dengue, Zika e chikungunya pode ser realizado de duas formas: indireto ou direto. O método indireto baseia-se nos testes sorológicos que vão detectar os anticorpos circulantes contra um determinado patógeno, nesse caso o vírus. O exame mais usado é o ELISA (ensaio de imunoadsorção enzimática) que detecta anticorpos IgM específicos contra o vírus em estudo. Este pode ser realizado a partir do 4º dia da doença, no momento em

que os anticorpos possam ser detectados. Somente uma amostra de soro é necessária para realizar o procedimento, no entanto os testes sorológicos podem dar resultados falso-positivos por causa das reações cruzadas com outros vírus da mesma família (CDC, 2016; Brasil, 2017c).

O método direto trata-se das técnicas moleculares para a pesquisa do RNA viral, por meio da amplificação do material genético. A técnica geralmente utilizada é a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) e é a metodologia de diagnóstico com maior especificidade para detecção dos vírus DENV, ZIKV, e CHIKV. Este possibilita a identificação dos vírus e a diferenciação dos sorotipos em questão, com a vantagem de ser sensível, rápido, reprodutível e simples. É recomendado ser realizado durante o período virêmico da doença (no máximo até 5-8 dias após a infecção dependendo do vírus). Esta é uma ferramenta importante no diagnóstico precoce da infecção, caso não seja realizado nesse período o resultado pode ser negativo, sendo necessário a realização dos testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos (Brasil, 2016b; Brasil, 2017c; Brasil, 2016c).

DENV, CHIKV e ZIKV são transmitidos pelo mesmo mosquito (*Ae. aegypti*), suas distribuições se sobrepõem em várias áreas endêmicas, e as manifestações clínicas são semelhantes principalmente na fase inicial da infecção. Todavia, qualquer um desses arbovírus é capaz de causar complicações graves. Entretanto, as complicações requerem manejos clínicos mais específicos. Desse modo, é importante o diagnóstico específico e simultâneo desses vírus (PABBARAJU et al., 2016).

As técnicas moleculares são regularmente utilizadas, mas além das técnicas PCR e RT-PCR habituais, outras modalidades desses ensaios foram criadas e podem ser empregadas para detectarem as arboviroses. Dentre estas, está a RT-qPCR *Multiplex*, com propósito de promover a diferenciação entre várias espécies ou entre vários gêneros concomitantemente em uma única reação, diminuindo as possibilidades de contaminação e tornando-se um ensaio mais prático e simples. Esta foi adotada mundialmente e consiste na amplificação simultânea de uma sequência alvo na reação pela combinação de diferentes pares de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) que são específicos para cada uma das sequências

dos vírus que causam dengue, Zika e chikungunya, descritas nesse estudo. Esta modalidade facilita o fluxo de trabalho molecular e tende diminuir os custos dos testes, melhorando a detecção desses três arbovírus humanos (OLIVEIRA et al., 2007; WAGGONER et al., 2016; PABBARAJU et al., 2016; MULLER, DEPELSENAIRE & YOUNG, 2017).

1.5 ARBOVÍRUS NOS VETORES

Os mosquitos são insetos vetores de importância médica, pois transmitem patógenos aos seres humanos, como por exemplo os arbovírus, que são responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade. Os mosquitos são classificados dentro do reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, Subordem Nematocera e família Culicidae. Atualmente são descritas 3.564 espécies na família Culicidae a qual é subdividida em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae, sendo esta última a maior subfamília de mosquitos, compreendendo 3.076 espécies e 110 gêneros, dentre os quais destacam-se *Aedes* e *Culex* (ALMEIDA, 2011; AMARAL & DANSA-PETRETSKI, 2012; HARBACH, 2019).

Para que o ciclo de transmissão ocorra o vírus deve ser transmitido pelo mosquito competente. Inicialmente, deve ocorrer a ingestão do sangue virêmico do hospedeiro vertebrado. Em seguida, as partículas virais infectam e se replicam nas células epiteliais do intestino médio do vetor até atingir um alto título viral. Logo após consolidada a infecção neste órgão, chegam à hemocele, onde replicam e se disseminam. Alcançam então as glândulas salivares por meio da corrente hemolinfática ou hemolinfa (líquido que banha os órgãos em geral) ou infectam outros órgãos como o corpo gorduroso e os ovários. Enfim, as células epiteliais das glândulas salivares liberam os vírus que são simultaneamente transportados com a saliva, por meio dos ductos salivares, para um novo hospedeiro vertebrado no decorrer do repasto sanguíneo (BLACK IV et al., 2002; SALAZAR et al., 2007).

O período de incubação extrínseco (PIE) é o intervalo de tempo entre o repasto sanguíneo virêmico e a transmissão de partículas virais infectantes pela saliva do mosquito. É importante, pois a colaboração entre o PIE, vírus e hospedeiro pode ser comprometida por fatores ambientais, como temperatura e umidade. Do mesmo modo, os fatores intrínsecos como competência vetorial e carga viral dos

hospedeiros vertebrados também podem influenciar essa relação (BLACK IV et al., 2002).

Somente as fêmeas dos mosquitos são hematófagas. Realizar a atividade hematofágica possui relevância na dinâmica de transmissão de patógenos. Desse modo os insetos vetores transmitem os patógenos para os seres humanos, tornando-os hospedeiros. O relógio circadiano interno dos mosquitos regula as atividades diárias de hematofagia, alimentação, locomoção, cópula, eclosão, oviposição, entre outros. Diferentes espécies de mosquitos apresentam espectro completo de padrões de atividade, normalmente desempenham essas atividades em algum período do dia, o que define seu hábito como diurno, crepuscular ou noturno. Entender essas atividades é necessário para caracterizar a biologia das espécies, do mesmo modo que a dinâmica de transmissão de patógenos por insetos vetores (GENTILE et al., 2009; AMORETTY et al., 2013; PANCETTI, 2017).

Nesse contexto, podemos destacar a importância do padrão de infecção do arbovírus no mosquito competente, ou seja, a capacidade que este possui em infectar-se, permitir a replicação, disseminação e transmissão desse vírus, denominada competência vetorial (CV) (BLACK IV et al., 2002; FRANZ et al., 2015).

De acordo com Amraoui et al. para determinar a CV necessita-se de três parâmetros: 1) A taxa de infecção, que consiste em medir a proporção de mosquitos com o corpo infectado (incluindo intestino médio) entre o número de mosquitos testados; esse parâmetro demonstra se o mosquito é capaz de ser infectado após o repasto sanguíneo infectado; (2) eficiência da disseminação, que refere-se a porcentagem de mosquitos com a cabeça infectada entre o número de mosquitos estudados; indica a capacidade do vírus passar pela barreira do intestino, alcançar o hemocele e infectar órgãos internos; e (3) capacidade de transmissão, que indica a proporção total de mosquitos que possuem vírus na saliva entre o número de mosquitos avaliados (AMRAOUI et al., 2016).

A CV para o arbovírus pode ser comprometida por fatores e mecanismos intrínsecos (genéticos) que regulam a capacidade do mosquito vetor de adquirir, replicar e transmitir o vírus. Esses fatores genéticos relacionados a CV são vias inatas associadas a imunidade e barreiras teciduais no mosquito e apresentam diferenças entre espécies de mosquito e populações ou cepas. Para que a parceria

seja bem sucedida é importante que o arbovírus consiga atravessar várias barreiras teciduais presentes no mosquito, possibilitando a entrada do vírus, sua disseminação nos tecidos e, subsequentemente, sua transmissão. Essas barreiras são classificadas como: a barreira de infecção do intestino médio, a barreira de escape do intestino médio e a barreira da glândula salivar ou barreira de transmissão (Figura 2) (BLACK IV et al., 2002; AMARAL & DANSA-PETRETSKI, 2012; FRANZ et al., 2015).

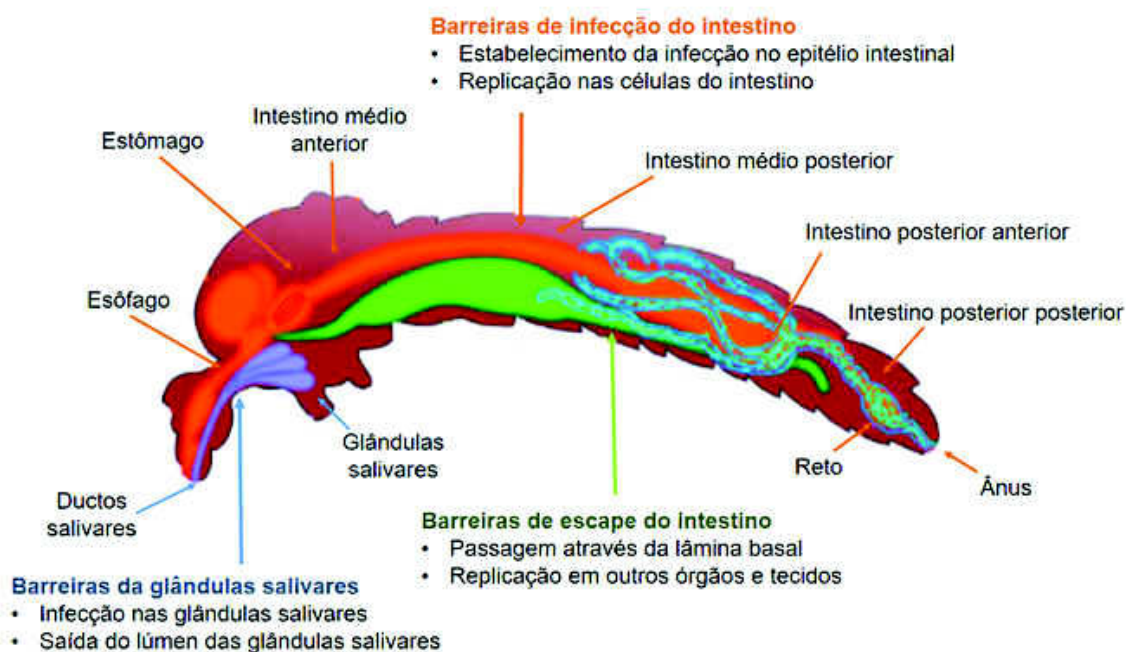


Figura 2 - Barreiras que o arbovírus deve superar para infectar com sucesso o mosquito para futuramente transmiti-lo.

Fonte: Adaptado de Amaral e Dansa-Petretski (2012).

Nas espécies de mosquitos que contêm a barreira de infecção do intestino médio, o arbovírus não é capaz de infectar e replicar nas células do intestino ou quando consegue, resulta em baixa replicação. No caso da barreira de escape do intestino, resulta no bloqueio e impedimento da disseminação da infecção nos tecidos secundários. Já nas espécies que possuem a barreira de infecção das glândulas salivares, o patógeno acaba não infectando-as. Em virtude disso, o mosquito não conseguirá transmitir o vírus ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo (BOSIO, BEATY & BLACK IV, 1998; BLACK IV et al., 2002). Acredita-se

que apenas algumas espécies de arbovírus e/ou cepas são adaptadas para superar com êxito os fatores genéticos associados à CV (FRANZ et al., 2015).

A infecção do vetor é essencial para manter o vírus circulando na natureza, dessa forma é fundamental identificar os vírus que são transmitidos por esses vetores (BARBOSA et al., 2016). Estudos relatam surtos causados por arbovírus em várias regiões do mundo. Esses vírus, como os que causam dengue, Zika e chikungunya, são transmitidos principalmente por *Ae. aegypti* (BARBOSA et al., 2016; ROTH et al., 2014; CARDONA-OSPINA, DIAZ-QUIJANO & RODRÍGUEZ-MORALES, 2015; MUSSO, CAO-LORMEAU & GUBLER, 2015), enfatizando a capacidade desses vírus infectarem o mosquito competente e serem transmitidos para seres humanos por meio do repasto sanguíneo. Além disso, podem ser transmitidos verticalmente para a prole dos mosquitos (BARBOSA et al., 2016; BARBOSA et al., 2017; ROTH et al., 2014; COSTA et al., 2018; FERREIRA-DE-LIMA & LIMA-CAMARA, 2018; ZAYED et al., 2012).

Embora o ZIKV seja transmitido por *Ae. aegypti*, estudo realizado em Recife-PE detectou a presença desse arbovírus nas glândulas salivares, intestino médio e saliva de *Cx. quinquefasciatus* alimentados artificialmente, além de conseguirem isolar também o ZIKV em mosquitos capturados em campo (GUEDES et al., 2017). Em outro estudo, realizado na China, demonstrou-se a presença do ZIKV em *Cx. quinquefasciatus* na saliva e nas glândulas salivares até 8 dias e 10 dias, respectivamente, após a refeição de sangue infectado. Concomitantemente, em outro experimento de transmissão, identificou-se a presença desse arbovírus em camundongos após serem picados por mosquitos infectados (GUO et al., 2016). Esses resultados apontam que o ZIKV tem a capacidade de se replicar nos tecidos e possivelmente ser transmitido por *Cx. quinquefasciatus*.

1.6 O VETOR *Aedes aegypti*

Os mosquitos do gênero *Aedes* são os principais transmissores de dengue, Zika e chikungunya, por sua competência vetorial. Sua anatomia não bloqueia o vírus com eficiência, colaborando para que o mesmo possua maior facilidade de infectar os tecidos do mosquito (BLACK IV et al., 2002; LI et al., 2012). As espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* destacam-se como vetores dessas

arboviroses (VEGA-RUA et al., 2013; VEGA-RÚA et al., 2014). *Aedes aegypti* é o principal vetor desses vírus nas áreas urbanas, por ser um vetor altamente antropofílico. Essa espécie contribuiu para a rápida disseminação e adaptação dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV em nosso ambiente, tornando-os transmissíveis para humanos (FIGUEIREDO, 2015).

Presume-se que esse mosquito seja originário do Velho Mundo, deslocando-se com o homem em sua extensa e contínua dispersão pelo mundo, inicialmente por meio do tráfico de escravos, embarcações, trens, automóveis, aviões entre outros, estabelecendo em ambiente propício para sua proliferação (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; BROWN et al., 2014). Baseado nos relatos históricos da emergência de dengue na Ásia, acredita-se que no final do século XIX, a disseminação desse mosquito tenha alcançado essa região (BROWN et al., 2014).

Possivelmente, esse vetor propagou-se nas Américas por meio de barcos provenientes da Europa, que atravessavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações europeias ao Novo Mundo. No Brasil, as primeiras identificações registradas foram realizadas em 1898 pelo cientista Lutz e em 1899 por Ribas (BRAGA & VALLE, 2007). Atualmente é considerado cosmopolita, pois pode ser encontrado em todos os continentes, incluindo a América do Norte e a Europa (KRAEMER et al., 2015; HAHN et al., 2017). No Brasil, está disseminado em todos os estados brasileiros (LIMA-CAMARA, HONÓRIO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2006).

Aedes aegypti é classificado morfológicamente como um mosquito de porte médio, possui coloração marrom escura em todo corpo, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais, um desenho em forma de lira no mesonoto, no clípeo possui dois tufo de escamas branco-prateadas e escamas claras nos tarsos e palpos que possibilitam a identificação dessa espécie. As fêmeas são diferentes dos machos, principalmente por possuírem antenas pilosas e palpos maxilares mais curtos que a probóscide (Figura 4C) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

As fêmeas são anautógenas e realizam a atividade hematofágica durante o crepúsculo matutino e vespertino (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). As fêmeas preferem depositar seus ovos isoladamente nas paredes dos recipientes artificiais com água relativamente limpa, embora tenha sido observado também em ambientes

com elevados graus de poluição (BESERRA et al., 2009; MARQUES et al., 2013). Esses criadouros costumam ser de uso doméstico e acumulam água no domicílio ou peridomicílio, como por exemplo caixas d'água, pneus, latas, vasos de flores entre outros. A escolha adequada desses reservatórios é importante para a distribuição e o estabelecimento das populações desses mosquitos (BRAGA, VALLE, 2007 & MARQUES et al., 2013).

Aedes aegypti é um mosquito holometabólico, ou seja, desenvolvem por meio de metamorfose completa, e o seu ciclo de vida contém quatro estágios: ovo, larva (quatro estádios larvais), pupa e adulto (Figura 3) (BRASIL, 2001a; CARVALHO & MOREIRA, 2017). Os ovos são côncavos, elípticos, de coloração esbranquiçada no momento da oviposição no meio aquático, em seguida tornam-se escuros (Figura 4A). A “casca” dos ovos dos mosquitos, é denominada como cório, e o exocório normalmente possui ornamentações que ajudam na identificação específica (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). No decorrer da embriogênese de diversos mosquitos vetores, é formada uma matriz extracelular denominada cutícula serosa. Esta envolve o embrião inteiro e torna-se parte da casca do ovo, é um componente primordial, resultando na redução fluxo de água e conferindo resistência à dessecação por longos períodos e persistem latentes até o próximo período chuvoso (FARNESI et al., 2015; FARNESI et al., 2017).

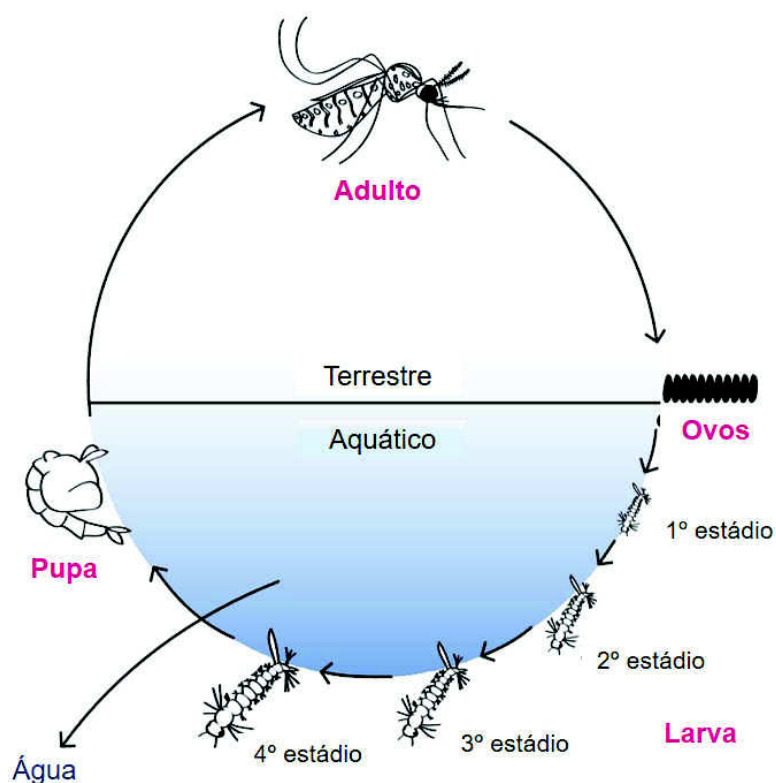


Figura 3 - Fases do ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

Fonte: Adaptado de COON et al. (2014).

A fase larval possui quatro estádios aquáticos. Essa fase é o período de alimentação e crescimento, onde as larvas alimentam frequentemente de material orgânico aglomerado nas paredes e fundo dos recipientes. As larvas possuem cabeça, tórax, com cerdas orais fortes, tórax globoso e abdômen estreito, com 8 segmentos, com sifão respiratório (Figura 4D). Fatores como temperatura, densidade das larvas no criadouro e disponibilidade de alimento podem interferir na duração dessa fase. No entanto, em condições favoráveis, o período entre a eclosão e a pupação não passará de cinco dias. Do contrário, em baixa temperatura e falta de alimento, o último estágio larvário pode durar várias semanas, até a transformação em pupa (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; BRASIL, 2001a; HARBACH, 2007; COURET, DOTSON & BENEDICT, 2014).

As pupas possuem forma de vírgula, apresentam cefalotórax grande e abdômen longo e encurvado, terminando em paletas natatórias (Figura 4B). Essa fase dura em torno de dois a três dias. Durante a fase pupal não há alimentação, podem permanecer inativas e flutuando na superfície da água, contribuindo para a

emergência do adulto (SILVA, MARIANO & SCOPEL, 2008; BRASIL, 2001a; ALMEIDA, 2011).

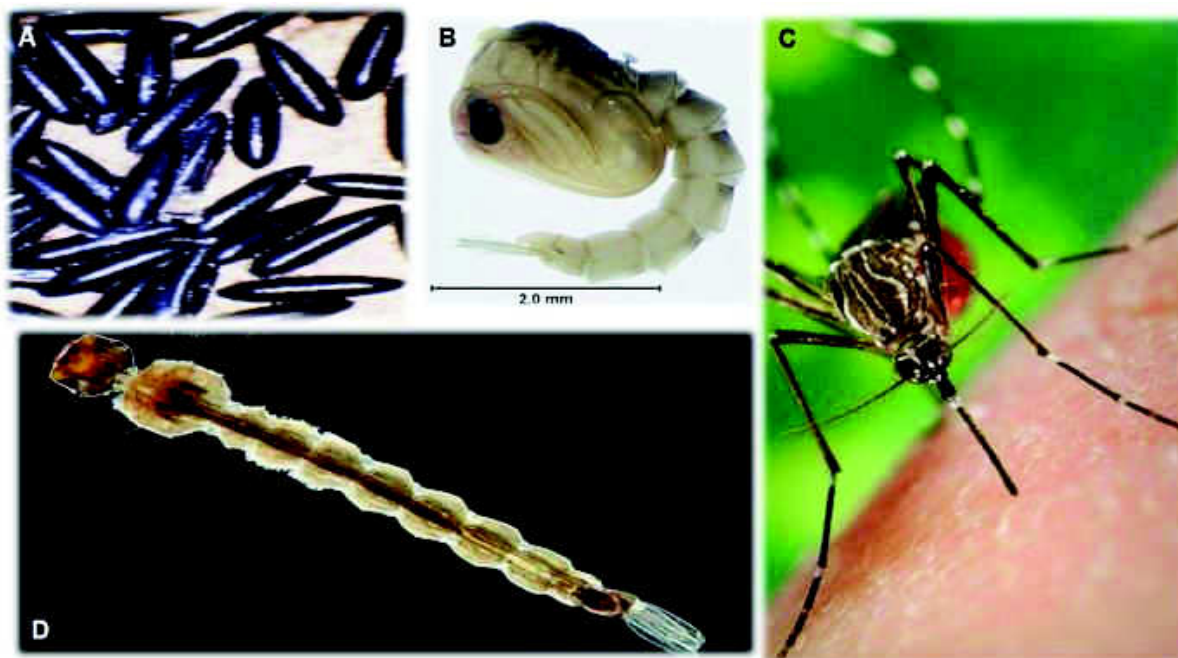


Figura 4 - Estágios do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. A: Ovos; B: Pupa; C: Fêmea adulta demonstrando a "lira branca" no lado dorsal do tórax; D: Larva no 4º estágio.

Fonte: Adaptado de Universidade da Flórida (2008).

Aedes aegypti possui alta capacidade reprodutiva, este é um fator que contribui para o sucesso do estabelecimento e disseminação dessa espécie em várias regiões. Apenas uma fêmea pode colocar em torno de 100 ovos por ciclo gonodotrófico e os distribuem em vários criadouros complicando o controle desse vetor em uma determinada área (CARVALHO & MOREIRA, 2017).

1.7 *Culex quinquefasciatus*

Os mosquitos do gênero *Culex* possuem distribuição cosmopolita e são importantes vetores de doenças tropicais negligenciadas, como a filariose linfática e arboviroses, incluindo febre do Nilo Ocidental, febre do vale Rift e encefalite de Saint Louis (MAIA et al., 2014; HEINEN et al., 2015; SHAIKEVICH et al., 2016). Esse gênero inclui 768 espécies divididas entre 26 subgêneros. O Subgrupo Pipiens compreende quatro espécies *Culex australicus*, *Culex globocoxitus*, *Culex pipiens* e *Culex quinquefasciatus*. Normalmente, nas regiões tropicais e subtropicais incluindo

as terras africanas, Américas, Austrália e Ásia encontram a espécie *Cx. quinquefasciatus*. Nas regiões temperadas como Europa, Ásia, África, Austrália e América do Norte e do Sul habita a espécie *Cx. pipiens* (FARAJOLLAHI et al., 2011; HARBACH, 2012). Entretanto, ambas espécies sobrepõem em várias regiões e a presença de híbridos foi relatada (SHAIKEVICH et al., 2016; CARDO et al., 2017).

No Brasil, *Cx. quinquefasciatus* possui ampla distribuição nas áreas urbanizadas (LAPORTA, URBINATTI & NATAL, 2006). Há relatos de híbridos no Uruguai e na região central da Argentina, contudo *Cx. pipiens* abrange regiões ao sul da Argentina (MORAIS et al., 2010).

Possivelmente, durante o século XVI até o século XIX *Cx. quinquefasciatus* tenha sido introduzido no Novo Mundo por meio do comércio de escravos que aconteceu do outro lado do Atlântico, tendo início nas partes central e ocidental da África. Porém, a dispersão desse mosquito para a Ásia e Austrália não está esclarecida. Acredita-se que ocorreu durante os séculos XV a XIX, por meio do comércio entre as colônias africanas, asiáticas, australianas, britânicas, holandesas e francesas. E através da Península Arábica pode ter sido introduzido na Ásia (HARBACH, 2012).

Esse mosquito cosmopolita é responsável por desconforto durante a noite, possui um zumbido característico, hábitos noturnos e por exposição às picadas alguns indivíduos podem desenvolver respostas alérgicas (CARDOSO et al., 2010). As fêmeas dessa espécie são antropofílicas, mas dependendo da disponibilidade, podem realizar o repasto sanguíneo em aves e gado (ARENSBURGER et al., 2010). Para diferenciar as espécies analisa-se as características da genitália dos machos adultos, pois as fêmeas adultas e os estágios imaturos do gênero *Culex* são morfologicamente semelhantes (MORAIS et al., 2010).

Os mosquitos adultos geralmente possuem coloração marrom clara. Os tarsos são escuros e sem marcação clara. O escudo apresenta tegumento marrom claro ou escuro, densamente recoberto de escamas amarelodouradas, estreitas, alongadas e curvas (parecidas com pestanas). A cabeça tem occipício com a região antero-central com escamas eretas forquilhadas esbranquiçadas, as laterais e posteriores escuras (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

As fêmeas depositam de 150 a 280 ovos em forma de "jangada" preferem habitats maiores e permanentes que contenham altas concentrações de matéria orgânica em decomposição, como efluentes de esgoto e fossas sépticas (Figura 5A). Contudo, as larvas dessa espécie encontram-se em recipientes artificiais, frequentemente preenchidos com água poluída ou ricas em orgânicos, mas dificilmente coabitam no mesmo reservatório com o vetor *Ae. aegypti* (Brasil, 2011; DAVID, RIBEIRO & FREITAS, 2012; HARBACH, 2012).

Os ovos são alongados e cada unidade possui corola em forma de taça na extremidade inferior e precisam estar constantemente em contato com a água, pois não resistem à dessecação (Figura 5B) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; Brasil, 2011). A cutícula é um componente primordial para a resistência do ovo à dessecação e essa característica varia entre as espécies. Os ovos de *Ae. aegypti* podem sobreviver por meses em ambiente seco, os de *Cx. quinquefasciatus*, nas mesmas condições, resistiriam por volta de um dia ou algumas horas (FARNESI, 2015).

A fase larvária dos Culicídeos é aquática. O corpo das larvas possui superfície glabra, incluindo um sifão longo (4 ou 5 vezes o valor da largura basal). A cabeça apresenta uma cerda pós-clipeal pouco desenvolvida, fina, simples ou bífida. O sifão respiratório é longo e possui 4 ou 5 vezes o valor da largura basal (Figura 5D), com cerda 1-S constituída de 4 cerdas desenvolvidas (de comprimento igual ou maior que a largura do sifão), aciculadas (pelo menos as basais), algumas implantadas fora de alinhamento (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Assim como as larvas de *Aedes*, as de *Culex* possuem sifão respiratório e ao subirem para respirar formam um ângulo na superfície da água (BORGES, 2014). Os fatores extrínsecos também podem afetar essa fase, mas a coexistência das duas espécies em condições de temperaturas diferentes e recursos limitados contribuem para que *Ae. aegypti* se sobressaia em relação a *Cx. quinquefasciatus* (SANTANA-MARTÍNEZ, MOLINA & DUSSÁN, 2017).

As pupas de *Cx. quinquefasciatus* são semelhantes a outras espécies de mosquitos. Possuem formato de vírgula e consistem em duas porções cefalotórax e abdome com oito segmentos. No começo a cor da pupa é a mesma da larva, quando mais próximo do momento da emergência do adulto mais escuro fica seu corpo (Figura 5C) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

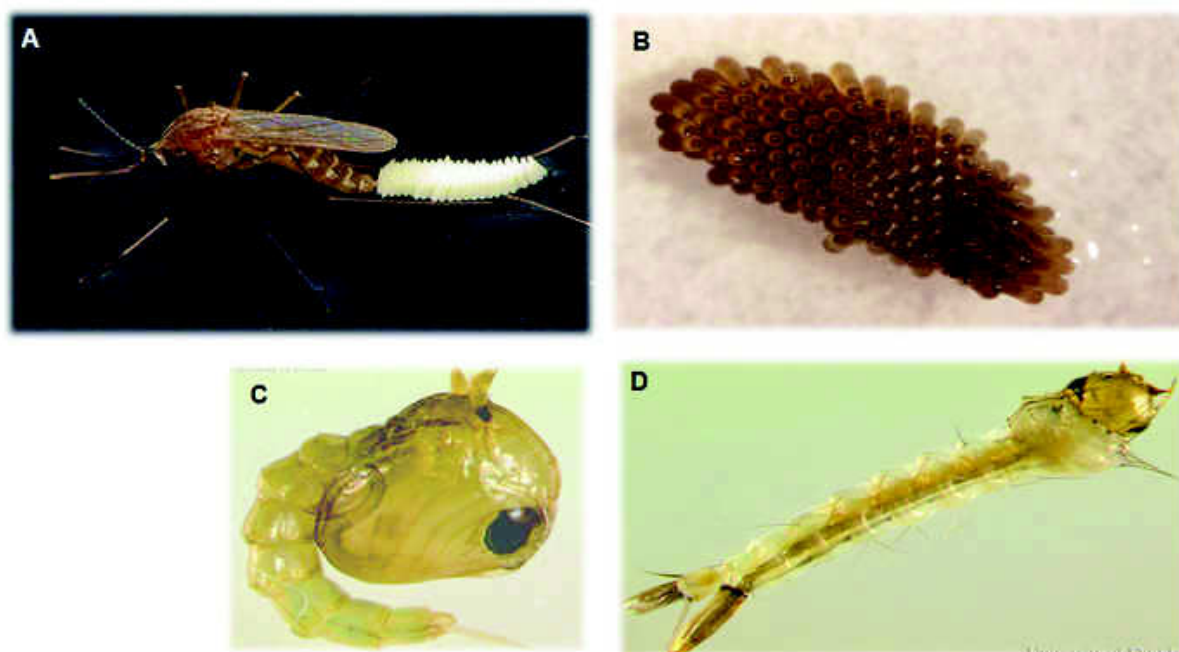


Figura 5 - Estágios do ciclo de vida do *Culex quinquefasciatus*. A: Fêmea adulta ovipositando ovos em forma de jangada; B: Jangadas mostrando a corola no pólo anterior de cada ovo; C: Pupa; D: Larva.

Fonte: Adaptado de Universidade da Flórida (2009).

As diferenças mais relevantes relacionadas ao comportamento dessas duas espécies de mosquitos são importantes principalmente para os programas de controle de vetores (Figura 6). Atualmente, *Ae. aegypti* é definido como o principal vetor das arboviroses mencionadas nesse estudo. Porém, alguns estudos sugerem que *Cx. quinquefasciatus* possa estar envolvido na transmissão do ZIKV (GUO et al., 2016; AYRES, 2016; GUEDES et al., 2017). Se for um possível vetor, os programas de controle de mosquitos terão que mudar suas estratégias.

	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
Coloração	Coloração marrom escura, com faixas brancas na bases do segmentos tarsais.	Geralmente marrom clara, possui dorso pardo-escuro com escamas amareladas e não possui faixa brancas nos segmentos.
Hábito	Diurno	Noturno
Hábito alimentar	Alimenta-se no período matutino e crepuscular. Pica principalmente pernas e pés.	Preferencialmente alimenta-se no período noturno e próximo aos membros superiores e face.
Criadouro	Depósitos de água parada (pouca matéria orgânica).	Depósitos de água suja e repletas de material orgânico.
Reprodução	Apresenta discordância gonodotrófica.	Apresenta concordância gonodotrófica
Postura	Deposita seus ovos próximo a água dos criadouros.	Deposita seus ovos sob a lâmina d'água dos criadouros.
Ovos	Ovos dispostos de forma espelhada e são resistentes á dessecação.	São agrupados sob a forma de jangada e não são resistentes á dessecação.

Figura 6 - Principais diferenças entre os mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Adaptado de FERNANDES (2017, p. 24).

1.8 CONTROLE DE VETORES

O controle vetorial é uma estratégia importante para os principais programas de controle, com a finalidade de prevenir a disseminação das doenças transmitidas por vetores (WHO, 2006). Para que essas estratégias sejam bem sucedidas é importante a participação ativa da população, reforçando a conscientização sobre os riscos da disseminação das doenças, como as causadas por arbovírus. A eliminação física dos criadouros onde se encontram as larvas e pupas desses vetores, a implementação de saneamento adequado e aplicação de produtos para matar as formas imaturas e adultas desses mosquitos estão entre as principais medidas de controle (BILAL, AKRAM & ALI-HASSAN, 2012; ALVAREZ et al., 2014; DOUCOURE et al., 2014).

Em 2002, o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) foi criado devido ao aumento de notificações dos casos graves de dengue, reemergência e alta disseminação do sorotipo 3 no Brasil. Com o auxílio do Ministério da Saúde e dos estados, as secretarias municipais de saúde começaram a exercer e efetuar as

ações do PNCD. Este não tinha como objetivo apenas o combate do vetor, mas outros componentes fundamentais: vigilância epidemiológica, assistência aos pacientes, integração com atenção básica, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, capacitação de recursos humanos, legislação, sustentação político-social e acompanhamento e avaliação do próprio programa (Brasil, 2002).

A partir de 2016, o Decreto nº 8.901 criou o Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS). Composto este departamento se encontra a Coordenação Geral dos Programas Nacionais de Controle e Prevenção da Malária e das Doenças Transmitidas pelo Aedes. Através desse órgão que o Governo Federal define as diretrizes que orientam as ações de vigilância, prevenção e controle da dengue, Zika e chikungunya que serão aplicadas nos estados (Brasil, 2017d).

As estratégias de controle epidemiológico são aplicadas em campo pelos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combate a Endemias (ACE), em colaboração com a população. São encarregados de realizar o controle mecânico e químico do vetor, e suas principais atribuições são: identificar focos, eliminar ou impedir a formação de criadouros em reservatórios naturais ou artificiais de água, bem como promover ações educativas no decorrer de visitas domiciliares, com o objetivo de orientar os moradores dos imóveis sobre a importância de eliminar os criadouros (BRASIL, 2009). Os principais mecanismos de controle usados são: mecânico, biológico e químico (ZARA et al., 2016).

O controle mecânico baseia-se na adoção de práticas simples e eficazes como proteção, destruição ou destinação adequada de criadouros, drenagem de reservatórios e instalação de telas em portas e janelas (BRASIL, 2001b).

O controle biológico consiste em reduzir a população de mosquitos por meio da predação (peixes larvófagos, copépodos), do parasitismo (nematóides), da competição e de agentes patogênicos (protozoários- microsporídios, *Bacillus* que produzem toxinas, fungos e vírus), com o objetivo de minimizar os danos ambientais. Os mais usados e com uma boa eficácia contra as larvas de culicídeos são: *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus*, sendo que a primeira opção

apresenta melhores resultados para *Ae. aegypti* (BRASIL, 2001a; DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

O controle químico implica na utilização de produtos químicos com a finalidade de controle das formas imaturas e da população de mosquitos adultos (JOSEPH et al., 2004). É recomendado o uso apenas em situações de emergência ou quando não houver outra estratégia de intervenção disponível. As modalidades de controle menos agressivas e eficazes são preferíveis (Brasil, 2001b). A aplicação de forma inadequada pode causar danos ao meio ambiente, pode eliminar outras populações que não são alvo e desenvolver resistência por parte dos vetores (KUMAR et al., 2014). Para a forma larvária é realizado o tratamento focal, que consiste na aplicação de um larvicida (biólogico ou químico) nos criadouros. Para os mosquitos adultos, a maioria dos programas realizam dois métodos de intervenção com adulticida: o tratamento perifocal, uma aplicação de inseticida com ação residual nas residências de modo rotineiro, e o tratamento ultra baixo volume (UBV), que é aconselhado a aplicação em período de transmissão (DONALÍSIO & GLASSER, 2002). Este último método, trata-se de partículas muito pequenas aplicadas com o auxílio de um equipamento montado no veículo, a Ultra Baixo Volume (UBV pesado) ou Ultra Baixo Volume portátil (UBV costal/portátil). A pulverização é realizada no período da manhã e ao anoitecer e em ambiente extradomicilar, no mínimo uma vez, deve-se realizar a aplicação, começando do quarteirão, onde houve a notificação, dando continuidade aos quarteirões contíguos e considerando um raio de 150 metros. Após confirmação do bloqueio da transmissão poderá cessar as atividades (Brasil, 2009).

Ao longo dos anos, têm sido usados inseticidas para controle de vetores, principalmente para os que transmitem arboviroses, como *Ae. aegypti*. Dentre esses destacam os inseticidas sintéticos: organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides (KARUNARATNE et al., 2013). O primeiro inseticida com propriedades duradouras ou residuais, foi produzido durante a Segunda Guerra Mundial, denominado DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), e que faz parte do grupo organoclorados (ROZENDAAL, 1997). Esse grupo possui em sua composição o carbono, hidrogênio e cloro. Atuam sobre sistema nervoso central, sendo capazes de desequilibrar o canal de entrada e saída de íons (sódio e potássio) dos axônios,

comprometendo a transmissão de impulsos nervosos em insetos e mamíferos. No Brasil, esse grupo não é mais utilizado para controle de vetores e já foi substituído por outros produtos, mas em alguns países continuam a utilizar, principalmente o DDT, pois carecem de recursos para substituição (BRASIL, 2001b; BRAGA & VALLE, 2007).

Os organofosfatos incluem os inseticidas que possuem fósforo. Esses inseticidas agem fosforilando uma enzima importante do sistema nervoso central, a Acetilcolinesterase (AChE), resultando na sua inibição e inativação de forma irreversível. Seu acúmulo nas junções nervosas interrompe a propagação do impulso elétrico. Portanto, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, provocando paralisia que pode resultar na morte do inseto (SANTOS et al., 2007). No Brasil, por muito tempo o Temephos foi usado como larvicida, e recentemente foi substituído, pois foi documentado resistência a esse produto em populações de mosquitos de diversas regiões do país (CARVALHO et al., 2004; BRAGA et al., 2004; DINIZ et al., 2014; DIAS et al., 2017).

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico. Assim como os organofosfatos, também inibem a enzima AChE, contudo a reação é reversível. A ação sobre os vetores é rápida e letal, mas seu uso é restrito pelo seu alto custo (BRASIL, 2001b; BRAGA & VALLE, 2007).

Os piretróides apresentam mecanismo de ação similar ao dos organoclorados, pois interagem com os canais de sódio das membranas dos neurônios, mantendo-os abertos, como consequência modificam a condução dos impulsos nervosos. Os canais de sódio dos insetos possuem sensibilidade maior a esse tipo de inseticida que os canais de sódio dos mamíferos. Comparado aos demais grupos de inseticidas os piretróides são mais estáveis, eficazes e são biodegradáveis (VAIS et al., 2001; BRASIL, 2001b; DONG et al., 2014).

O uso de inseticidas para o controle de mosquitos na saúde pública possui algumas recomendações, principalmente na aplicação, deve ser de maneira seletiva tanto nas atividades de rotina, bem como nas de emergências. O MS segue as orientações da OMS (BRASIL, 2001b).

As populações de mosquitos vetores podem desenvolver resistência aos inseticidas quando são constantemente expostos. Estes desenvolvem resistência

por meio do aumento da atividade enzimática. Os mosquitos que demonstram resistência aos inseticidas, desenvolvem maior sobrevivência que os indivíduos desprovidos da mesma. Dessa forma, os genes de resistência serão transmitidos para gerações futuras, tornando-se dominantes na população e contribuindo para falhas dos programas de controle vetorial, principalmente quando são fundamentados em apenas um método de controle. É importante compreender as alternativas usadas para controle desses vetores, com o objetivo de prevenir ou bloquear futuros mecanismos de resistência e criar novas metodologias eficazes para controlar espécies resistentes (KARUNARATNE et al., 2013).

O Controle Legal (CL) é amparado pela lei nº 13.301, de 27 de junho de 2016, fundamentado no uso de medidas de vigilância em saúde no momento em que é observado uma situação de perigo à saúde pública pela presença do vetor que transmitem os vírus que causam dengue, Zika e chikungunya. Dentre essas destacam-se: obrigatoriedade da limpeza semanal dos imóveis, identificar e eliminar os focos de mosquitos vetores; campanhas educativas e de orientação à população principalmente para os grupos de riscos; e autorização para ingresso forçado pelos ACEs em imóveis públicos ou privados dependendo da situação (ausência e recusa do morador ou abandono do imóvel, entre outras). Permanece em vigor enquanto perdurar a Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) (Brasil, 2016).

Atualmente, novas estratégias são utilizadas para o controle de mosquitos e com resultados promissores: como a) uso da *Wolbachia*, uma bactéria intracelular obrigatória que encontra-se no citoplasma das células hospedeiras onde se replica (GLASER & MEOLA, 2010; JIGGINS, 2017); b) a esterilização dos machos por irradiação, para posteriormente serem soltos no campo e acasalarem com fêmeas com o propósito de gerar proles inviáveis (CARVALHO & MOREIRA, 2017); c) aplicação de Reguladores de Crescimento (*Insect Growth Regulator- IGR*), destacando o uso de Estações Disseminadoras (EDs) tratadas com o Piriproxifeno (PPF), um potente larvicida (ABAD-FRANCH et al., 2015). Além dessas, existem a abordagem eco-bio-social, uso de compostos naturais como os óleos essenciais de plantas, dispositivos plásticos para uso doméstico que liberam inseticidas lentamente e de forma contínua, roupas e telas impregnadas com inseticidas e o uso

de técnicas combinadas como a *Wolbachia* e SIT (*sterile insect technique*) por irradiação (ZARA et al., 2016).

Os Reguladores de Crescimento (IGRs) são usados como uma nova estratégia para o controle de vetores e são considerados a terceira geração de inseticidas. Os IGRs são diferentes dos outros métodos de controle convencionais, possuem vários grupos e são diferenciados de acordo com o modo de ação, como os análogos dos hormônios naturais dos vetores, inibidores da síntese de quitina e derivado de triazina. Geralmente, agem regulando a metamorfose ou interferindo na reprodução dos insetos, resultando na formação de adultos com anormalidades, principalmente a má formação na genitália, sendo incapazes de reproduzir ou até estéreis (TUNAZ & UYGUN, 2004; RESENDE & GAMA, 2006).

Os Análogos do Hormônio Juvenil (AHJ) interferem na metamorfose dos insetos, para alguns possuem maior eficácia no último estágio larvário. Esta fase é mais suscetível, pois o Hormônio Juvenil (HJ) encontra-se em baixo nível. Não induzem a morte rápida, mas prolongam o estágio larval e a mortalidade ocorre especialmente no estado de pupa. Assim, demonstram eficácia no controle de mosquitos vetores. Os AHJ comerciais são seguros, principalmente para o meio ambiente visto que possuem maior degradabilidade (TUNAZ & UYGUN, 2004).

Dentro desse grupo, podemos destacar o PPF (4-fenoxifenilo (RS)-2-(2-piridiloxi) éter de propilo), que pertence ao grupo químico éter piridiloxipropílico e está disponível desde o início dos anos 90 no mercado de agroquímicos, sendo empregado no controle de vários artrópodes (SIHUINCHA et al., 2005; BRASIL, 2014b). A OMS orienta o uso desse composto para o controle de algumas espécies de mosquitos, como os culicídeos, dentre esses os mosquitos *Ae. aegypti* e o *Cx. quinquefasciatus* (WHO, 2001).

De acordo com o manual do composto comercial Sumilarv, o PPF é um composto sólido de baixa volatilidade, possui pouca solubilidade em água e baixa toxicidade para mamíferos. Geralmente, os invertebrados aquáticos e peixes não sofrem efeitos adversos ao serem expostos a doses inferiores a 0,05 ppm. No caso de organismos como crustáceos, se forem expostos em doses maiores podem apresentar uma ligeira diminuição, sendo alterações reversíveis (SUMITOMO CHEMICAL, 2012).

O PPF atua como análogo do HJ no desenvolvimento do quarto estágio larvário com início da fase pupal, causando mortalidade e resultando na diminuição da emergência de mosquitos adultos. Essas fases são mais susceptíveis ao PPF (SUMITOMO CHEMICAL, 2012). Este larvicida está sendo usado em vários países para controle vetorial em setores públicos e privados, constatando bons resultados na diminuição da fertilidade e fecundidade de mosquitos adultos, como *Ae. aegypti*, quando estes em fase larvária foram expostos ao PPF (SIHUINCHA et al., 2005; MAOZ et al., 2017; SUMAN et al., 2018).

Esse inseticida têm sido considerado adequado para a autodisseminação por vários pesquisadores (DEVINE et al., 2009; CAPUTO et al., 2012; MAINS, BRELSFOARD & DOBSON, 2015; ABAD-FRANCH et al., 2015; CHANDEL et al., 2016; SUMAN et al., 2018; ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017; UNLU et al., 2017). Essa estratégia é uma abordagem que utiliza o próprio mosquito como veículo para disseminação do PPF, com a finalidade de reduzir as populações desses vetores. Por meio das EDs com água é possível atrair fêmeas adultas, ao pousarem na superfície da estação, as partículas de PPF vão aderir ao corpo da fêmea, transportando o larvicida para locais de reprodução, onde encontram-se mosquitos imaturos. As fêmeas são capazes de visitar vários criadouros, por conseguinte reproduzindo em diversos locais pequenos e de difícil acesso (crípticos), servindo como refúgio de métodos de controle convencionais. Por isso, o método baseado na autodisseminação têm sido eficaz para as espécies de mosquitos vetores (Figura 7) (MAINS, BRELSFOARD & DOBSON, 2015; ABAD-FRANCH et al., 2015; ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017; UNLU et al., 2017).



Figura 7 - Representação da abordagem baseada na disseminação realizada pelos mosquitos (auto-disseminação) com estação disseminadora (ED) contendo análogo de hormônio juvenil (PPF). A ED com água atrai as fêmeas, que pousam sobre a superfície da estação aderindo em seu corpo as partículas do produto (círculo vermelho). As fêmeas contaminadas, saem da ED e transferem o PPF para criadouros que possuem as formas imaturas dos mosquitos (larvas e pupas).

Fonte: Adaptado de Mains, Brelsfoard e Dobson (2015).

Em diversos países, estudos realizados em campo demonstraram resultados significantes em relação a eficácia do PPF e o uso das EDs, constatando que essas duas abordagens associadas são promissoras para o controle de vetores, principalmente em áreas urbanas (DEVINE et al., 2009; CAPUTO et al., 2012; CHANDEL et al., 2016; SUMAN et al., 2018; UNLU et al., 2017).

No Brasil, estudos demonstraram resultados significantes da disseminação do larvicida pelos próprios mosquitos em ambientes anteriormente não contaminados. Somente uma pequena dose do granulado do PPF foi necessária para sua ação direcionada nas larvas não expostas anteriormente, impedindo o desenvolvimento de mosquitos adultos (ABAD-FRANCH et al., 2015; ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017). Estes estudos foram realizados na região amazônica e apresentaram bons resultados para o controle de *Ae. aegypti*.

O primeiro (ABAD-FRANCH et al., 2015) em uma escala de bairro, onde foi observado decréscimo nas taxas mortalidade dos mosquitos adultos em aproximadamente 75% e uma redução 10 vezes maior na emergência dos

mosquitos. Um segundo estudo (ABAD- FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017) foi realizado numa escala municipal, com métodos similares, e os resultados apontaram uma redução de 80% a 90% na mortalidade dos mosquitos adultos e decréscimo de 96% a 98% na emergência dos mosquitos da espécie *Aedes*.

O PPF é usado no Brasil como larvicida para o controle vetorial desde o 2º semestre de 2014, utilizando a formulação granulada com concentração de 0,5 %, facilitando sua aplicação em campo. Estudos realizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde nos períodos de 2005 a 2007 e 2013/2014 evidenciaram a eficácia e durabilidade desse produto em média de oito semanas nos criadouros (Brasil, 2014b). Além disso, não existem evidências de alta resistência de *Ae. aegypti* ao PPF (LEYVA et al., 2010; HAMID et al., 2017) e as populações do Distrito Federal apresentaram elevado nível de suscetibilidade a esse larvicida (CARVALHO, 2018).

1.9 JUSTIFICATIVA

Existem várias arboviroses transmitidas por *Aedes aegypti* (dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana) e *Culex quinquefasciatus* (febre do Nilo Ocidental, febre do vale Rift e encefalite de Saint Louis), com grande impacto em saúde pública. Atualmente não existem agentes terapêuticos específicos para as arboviroses, como dengue, Zika e chikungunya e a única alternativa disponível para bloquear a transmissão dessas doenças é o controle vetorial.

O controle químico atual possui eficácia limitada pela dificuldade de acesso e o desenvolvimento de resistência. Há clara necessidade de alternativas para controle de mosquitos. A estratégia de disseminação de PPF é promissora, como já observado em Manaus, onde o PPF diminuiu o potencial reprodutivo dos mosquitos. Há necessidade de avaliação dessa estratégia de controle em novas áreas e com indicadores entomológicos baseados na quantidade de mosquitos adultos, como proposto no presente estudo.

Portanto, torna-se fundamental avaliar a presença de vetores e determinar a presença de arbovírus nos mosquitos ao longo dos meses. Assim, gerando dados

que permitem compreender melhor as características epidemiológicas dessas infecções, auxiliando nas medidas de prevenção e controle.

No Brasil, estudos com esta abordagem são recentes. Nossos resultados poderão contribuir com futuras pesquisas que objetivam bloquear a transmissão dessas arboviroses.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito de estações disseminadoras de piriproxifeno no controle de adultos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* e verificar a presença de arbovírus nesses mosquitos em São Sebastião, Distrito Federal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a quantidade de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em área controle e de intervenção durante 18 meses, antes, durante e após a instalação de estações de disseminação de PPF
- Investigar a presença de arbovírus causadores de dengue, Zika e chikungunya em mosquitos na região estudada.
- Comparar a proporção de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* positivos pelos vírus da dengue, Zika e chikungunya nas áreas de estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado com a colaboração de três laboratórios da Universidade de Brasília-UnB. A delimitação da área de estudo, captura dos mosquitos, instalação das estações disseminadoras com PPF, transporte e triagem dos mosquitos foram realizados com apoio do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores/FM/UnB. Posteriormente, as amostras foram levadas para o Laboratório Interdisciplinar de Biociências/FM/UnB onde foram armazenadas (freezer -80°C) até a realização da extração de RNA viral, quantificação. A RT-qPCR *multiplex* foi realizada no Núcleo de Medicina Tropical/UnB (Figura 8).

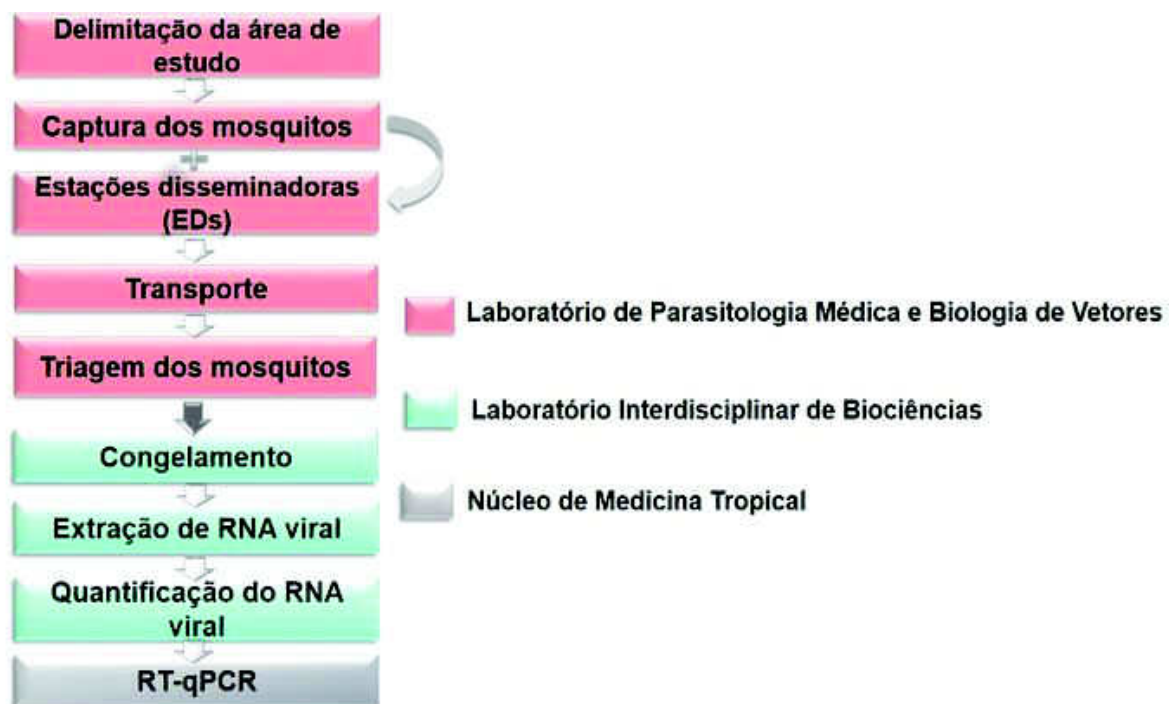


Figura 8 - Delineamento experimental do estudo.

3.2 LOCAL DE ESTUDO

O local de estudo onde foram realizadas as capturas/monitoramento dos mosquitos e instalação das Estações Disseminadoras (EDs) foi na Região Administrativa (RA) XIV do Distrito Federal, São Sebastião, localizada geograficamente nas coordenadas: Latitude -15,9028 S e longitude -47,776 O. Encontra-se na região sul da área de proteção ambiental do rio São Bartolomeu, a

23 km do Brasília e ocupa uma área de 383,71 km² (São Sebastião-..., 2017) (Figura 9 e 10).

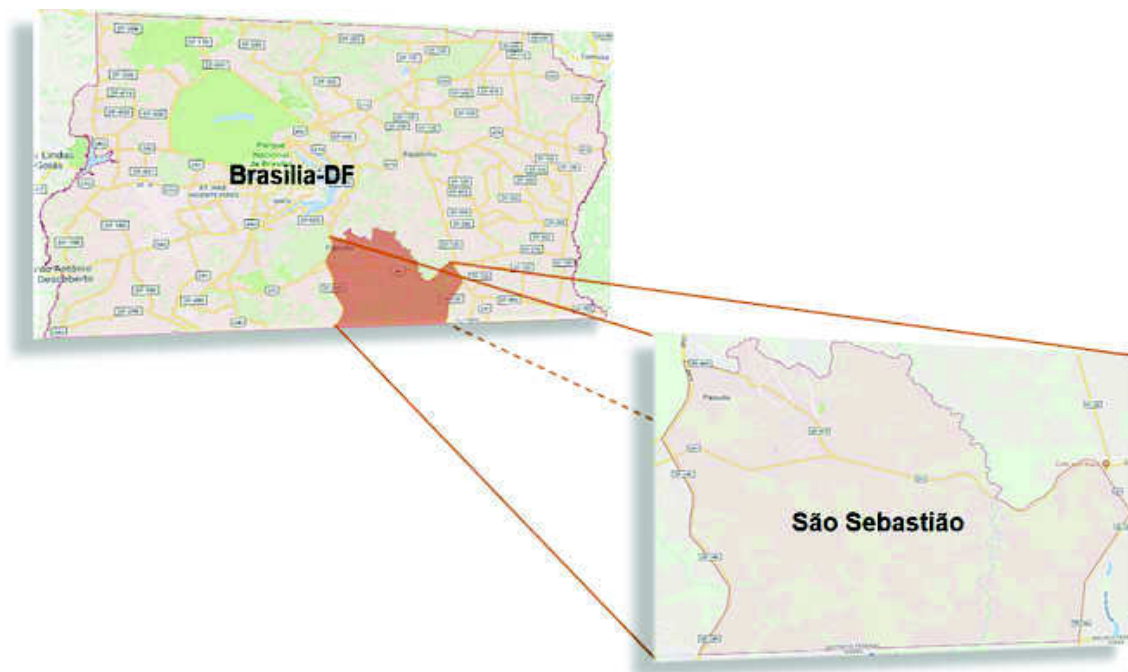


Figura 9 - Delimitação territorial da região administrativa de São Sebastião em relação a Brasília-DF
Fonte: Adaptado de Google Maps (2018)



Figura 10 - Região Administrativa XIV do Distrito Federal, São Sebastião mostrando organização das quadras e a localização de parques (verde).

Fonte: Adaptado de SEGETH (2018)

Em 2013, a população de São Sebastião-DF foi estimada em cerca de 97.977 habitantes. Essa RA possui elevações de vales com terrenos ondulados cortados pelos córregos Mata Grande e Ribeirão da Papuda. Apresenta um crescimento populacional notável, pois existem 12 bairros oficiais e outros que precisam ser criados oficialmente (São Sebastião-..., 2017). A incidência relatada de dengue em São Sebastião está entre as mais altas do DF; entre janeiro e maio de 2019, por exemplo, essa região registrou mais de 24.041 casos prováveis de dengue por 100.000 habitantes (BRASIL, 2019). O estudo foi realizado em dois bairros que foram escolhidos por estarem localizados nas extremidades leste e oeste de São Sebastião com intuito de maximizar a distância e diminuir as chances de dispersão de mosquitos de uma área para outra. O bairro de intervenção (AI, Residencial Oeste) foi selecionado por sorteio e o bairro Bosque (Área controle- AC) com cerca de 1000 casas e com uma distância de 2 km um do outro (Figura 11).



Figura 11 - Imagem satélite da área de estudo em representação dos dois bairros de São Sebastião. Em vermelho o Residencial Oeste (Área de Intervenção-AI) e em verde o Residencial Bosque (Área controle-AC). A linha branca representa a distância de 2 Km entre as duas áreas.

Fonte: Modificado de Google Earth (2016)

3.3 CAPTURA DOS MOSQUITOS

A captura dos mosquitos foi realizada em duas áreas da Região Administrativa de São Sebastião- DF, Residencial Oeste (AI) e Residencial Bosque (AC). Em cada bairro foram sorteadas 30 casas para realizar a captura e o estudo de monitoramento da ocorrência de mosquitos (Figura 12).



Figura 12 - Imagem de satélite mostrando a distribuição espacial dos locais de captura de mosquitos com aspiradores elétricos em São Sebastião, DF. A: Residencial Bosque (Área controle-AC). B: Residencial Oeste (Área de intervenção-AI).

Fonte: Adaptado de Google Maps (2018).

Para a captura de mosquitos nas residências de cada região, foram utilizados aspiradores elétricos descritos por Nasci et al. (1981) e comercializados pela Horst armadilhas. O aspirador elétrico grande é feito em PVC e alumínio com 75 cm de largura, um motor 12V e uma hélice de 5 pás. Os acessórios são: uma rede para reter os mosquitos adultos dentro do aspirador e a bolsa de couro para levar a bateria (de 12V e 5Ah) (Figura 13A). O aspirador elétrico pequeno é similar com motor 6V e uma hélice de 2 pás (Figura 13B). Os acessórios são: o copo/pote coletor onde os mosquitos adultos ficam armazenados para o transporte, o qual contém uma tampa em funil invertido feito com tela de malha fina (Figura 13C), e uma bolsa de couro pequena para levar a bateria (6V 4Ah).



Figura 13 - Aspiradores elétricos de Nasci (Horst armadilhas). A: Aspirador elétrico grande; B: Aspirador elétrico pequeno desacoplado do copo/pote coletor; C: pote coletor com a tampa em funil invertido.

Fonte: Empresa Horst armadilhas e o autor (2018).

As aspirações foram realizadas nas 60 residências da região, mensalmente, geralmente na primeira semana do mês, no período de 2 a 3 dias, durante 18 meses (janeiro de 2017 a junho de 2018). O tempo de aspiração em cada residência foi registrado e o número de mosquitos capturados por 10 minutos de aspiração foi considerado como indicador entomológico.

Após a autorização do morador (Apêndice A), uma dupla de pesquisadores entrava na residência, um desalojando os mosquitos e outro aspirando com o aspirador grande. As aspirações foram realizadas no interior da casa e no peridomicílio (quintais, garagens, jardins, etc). Os mosquitos aspirados foram retirados do aspirador grande com um aspirador pequeno acoplado ao pote coletor para transporte, os quais foram mantidos em caixas térmicas até a chegada no laboratório.

Em seguida, os mosquitos adultos capturados durante a aspiração foram identificados e separados em mesa refrigerada à -20°C (Figura 14) baseado em caracteres descritos e com o uso de chaves dicotômicas (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Foram realizadas a identificação taxonômica genérica e quantificação de machos e fêmeas, com o auxílio de estereoscópio binocular e pinça de ponta fina, com extremo cuidado para não danificar os mosquitos coletados e consequentemente não comprometer a identificação.

As fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foram separadas e os machos de todas as espécies foram descartados ou encaminhados para a coleção didática do laboratório. Após a identificação, as fêmeas foram separadas por espécie, número da casa, local da captura (intra/peridomicilar), em pools de até 10 indivíduos e foram inseridos em microtubos de 1,5 ml com RNAlater® (Life Technologies) (Figura 14), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras com RNAlater foram levadas para o Laboratório Interdisciplinar de Biociências da Universidade de Brasília e foram armazenadas no freezer -80°C até a realização da extração de RNA viral.

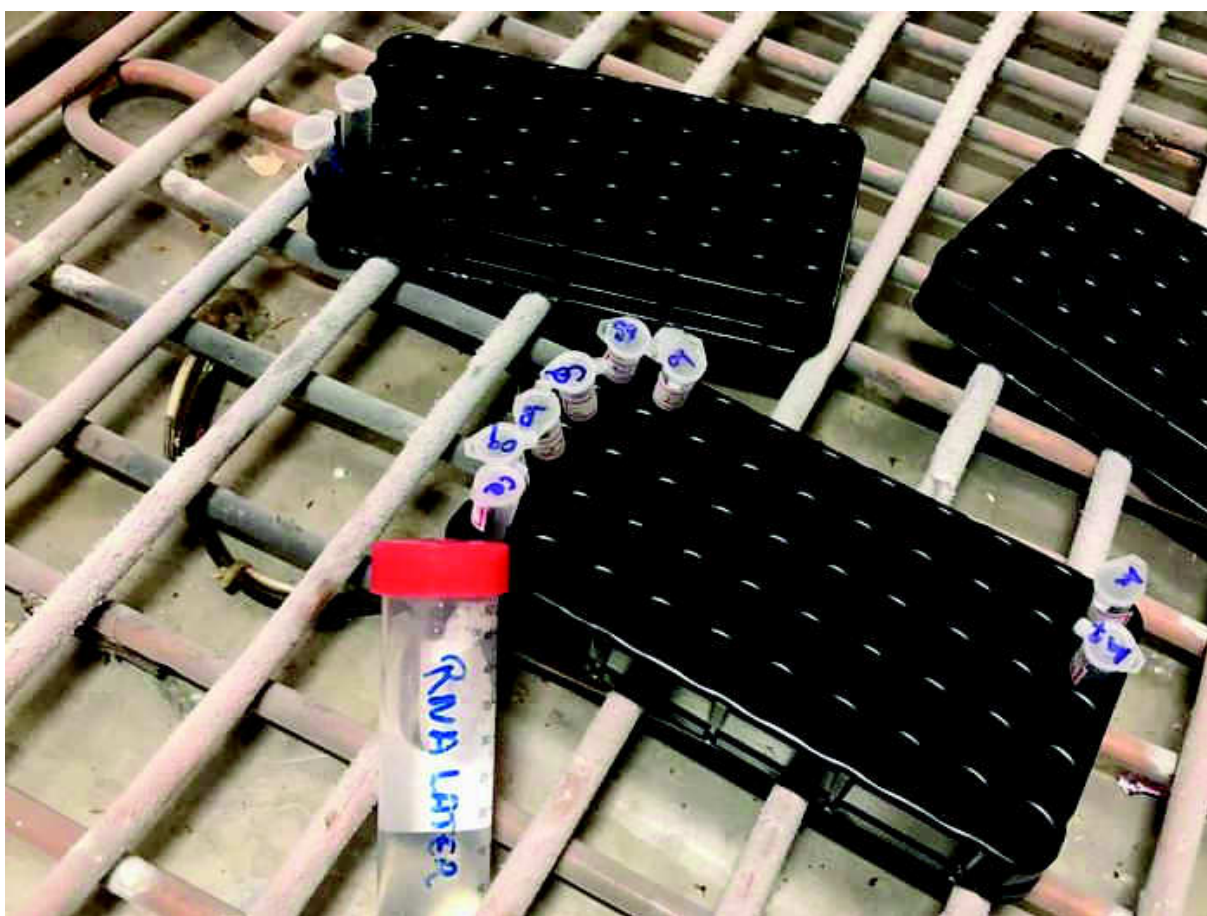


Figura 14 - Mesa refrigerada onde os mosquitos adultos foram identificados, separados e armazenados em microtubos com RNAlater®.

Fonte: O autor (2018).

3.4 PREPARO DOS POOLS DE MOSQUITOS

Foram selecionados os pools coletados no intradomicílio para a extração de RNA viral. Todos os pools de fêmeas de *Ae. aegypti* foram extraídos primeiro e em seguida os pools das cabeças das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*. O mesmo foi realizado para a análise por RT-qPCR *multiplex*. Essas medidas preventivas foram realizadas com objetivo de minimizar contaminação entre as amostras das duas espécies de mosquitos.

3.4.1 Fêmeas de *Aedes aegypti*

Antes da extração de RNA, cada pool de fêmeas de *Ae. aegypti* foi homogeneizado manualmente, o RNAlater foi retirado e descartado. Para remover os resíduos foi realizada uma lavagem em cada pool, adicionando 200µL de tampão

solução salina fosfatada (PBS ou STF), homogeneizado com a pipeta em torno de 3-6 vezes. Em seguida, a solução foi retirada e descartada. Novamente, foi utilizado 55µL da mesma solução de tampão para realizar a maceração dos pools.

3.4.2 Fêmeas de *Culex quinquefasciatus*

Foram retiradas as cabeças de todas as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, com o auxílio de estereoscópio binocular, pinça de ponta fina e bisel de agulhas hipodérmicas (0,45x13mm), antes da extração de RNA. Em seguida, foram transferidas para novos microtubos devidamente identificados. Para remover os resíduos de RNA later foi realizada uma lavagem em cada pool, adicionando 200µL de tampão PBS, homogeneizado com a pipeta (cerca de 3-6 vezes). Depois, a solução de tampão foi retirada e descartada. Subsequentemente, foi utilizando 55µL da mesma solução para realizar a maceração dos pools das cabeças.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL

De 55µL do macerado dos pools de ambas espécies foi retirado 50µL de cada uma para extração do RNA viral utilizando o kit MagMAX™ Pathogen RNA/DNA (ThermoFisher Scientific), conforme as instruções do fabricante.

Na placa Deep-Well de 96 poços, foram adicionados 50µL de cada amostra em cada poço, 132µL de *Lysis Binding Solution* e 20µL de *Bead Mix*. Em seguida, a placa foi agitada durante 3 minutos no *shaker* de placa em velocidade moderada. Posteriormente, a placa com as amostras foi colocada sobre a estante magnética e realizado a captura entre 1 a 3 minutos. Subsequentemente, o sobrenadante foi retirado e descartado sem desestruturar o sedimento. A placa foi removida da estante magnética.

Foram adicionados 150µL de *Wash Solution 1* previamente preparada. Em seguida, a placa foi agitada durante 1 minuto no *shaker* de placa em velocidade moderada. Imediatamente, a placa foi colocada sobre a estante magnética por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e descartado sem desestruturar o sedimento. A placa foi removida da estante magnética e o processo de lavagem 1 foi repetido.

Foram adicionados 150µL de *Wash Solution 2* anteriormente preparada. Em seguida, a placa foi agitada durante 1 minuto no *shaker* de placa em velocidade

moderada. Logo após, a placa foi colocada sobre a estante magnética durante 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e descartado sem desestruturar o sedimento. A placa foi removida da estante magnética e o processo de lavagem 2 foi repetido.

Subsequentemente, as amostras foram colocadas no *shaker* de placa em velocidade máxima durante 5 minutos para secar. A placa foi retirada, sendo em seguida adicionados em cada reação 90µL à 65°C de *Elute Buffer*, aquecida anteriormente. Em seguida, a placa foi colocada *shaker* em velocidade máxima por 3 minutos.

De acordo com as instruções, as amostras deveriam obter a coloração marrom. Caso não ocorresse, necessitariam ser ressuspendidas com a pipeta em torno de 6-8 vezes, sendo novamente colocadas no *shaker* de placa na velocidade máxima por mais 1 minuto.

A placa foi posicionada sobre a estante magnética durante 2 minutos. Em seguida, foram transferidos 85µL do sobrenadante, ácido nucleico obtido, de cada amostra para um novo microtubo estéril (RNA-free) devidamente identificado.

Como controle interno de toda reação (extração de RNA e RT-qPCR *multiplex*) foi usado Fago MS2 RNA (RNA Control Kit, ThermoFischer Scientific), conforme as recomendações do fabricante.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS

A quantificação do RNA extraído foi determinada por meio do espectrofotômetro Nanovue® (GE Healthcare Life Sciences), na qual foram avaliadas as concentrações de RNA e o grau de pureza das amostras definido pela razão entre as absorvâncias 260 e 280nm. Quando a razão dessas densidades óticas (A260/A280) foi entre 1.8 e 2.0, o grau de pureza do RNA foi considerado adequado para a realização das análises. Posteriormente, os RNAs foram armazenados no freezer -80°C.

3.7 ANÁLISE POR RT-qPCR *MULTIPLEX*

De posse das amostras de RNA realizou-se amplificação do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV-4), vírus Zika (linhagem asiática) e vírus chikungunya. A amplificação desses vírus foi realizada pelo método de RT-qPCR

Multiplex (Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa). As análises de RT-qPCR foram realizadas pela pós-doutora Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi.

Foi realizada uma reação por amostra para amplificar em uma única reação os três vírus. Essas foram realizadas em placas de 96 poços para um volume total de 25 µl por poço, sendo a concentração final de cada amostra 200ng de RNA total. Foram usados como controles positivos fragmentos do vírus clonados e genotipados dos vírus da dengue e chikungunya, cedidos pelo Dr. Fernando Dias da Fiocruz-RJ. O controle positivo de Zika foi fornecido pelo doutorando Danilo Corazza do Laboratório de Imunologia Celular/FM/UnB que cultivou o vírus a partir de amostra de sangue cedida pelo Dr. Paulo Souza do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). Fêmeas não infectadas de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller, cedida pelo Dr. Marcos Obara, foram utilizadas como controle negativo. Além disso, uma amostra que não continha RNA foi utilizada como controle negativo da reação. As amostras de RNA foram adicionadas a placas de 96 poços RT-qPCR do kit TaqMan Zika vírus *Triplex* Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) (Applied Biosystems, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a placa foi centrifugada por 15 segundos (*spin*), apenas para o RNA misturar com o liofilizado. As amostras foram processadas no termociclador QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Os vírus foram amplificados sob as seguintes condições descritas na Figura 15.

Etapas	Ciclo	Temperatura	Tempo
Transcrição reversa	1	50°C	20 minutos
Ativação	1	95°C	2 minutos
Amplificação	40	95°C	15 segundos
		60°C	1 minuto

Figura 15 - Condições em que os ciclos da RT-qPCR foram realizadas.

3.8 INSTALAÇÃO DAS ESTAÇÕES DISSEMINADORAS COM PPF

Após o terceiro mês de aspiração dos mosquitos em março de 2017, foram amostrados aleatoriamente 150 domicílios no Residencial Oeste (AI) para instalação do método de intervenção com estações disseminadoras (EDs) de PPF. Uma estação disseminadora foi instalada em cada residência (Figura 16).

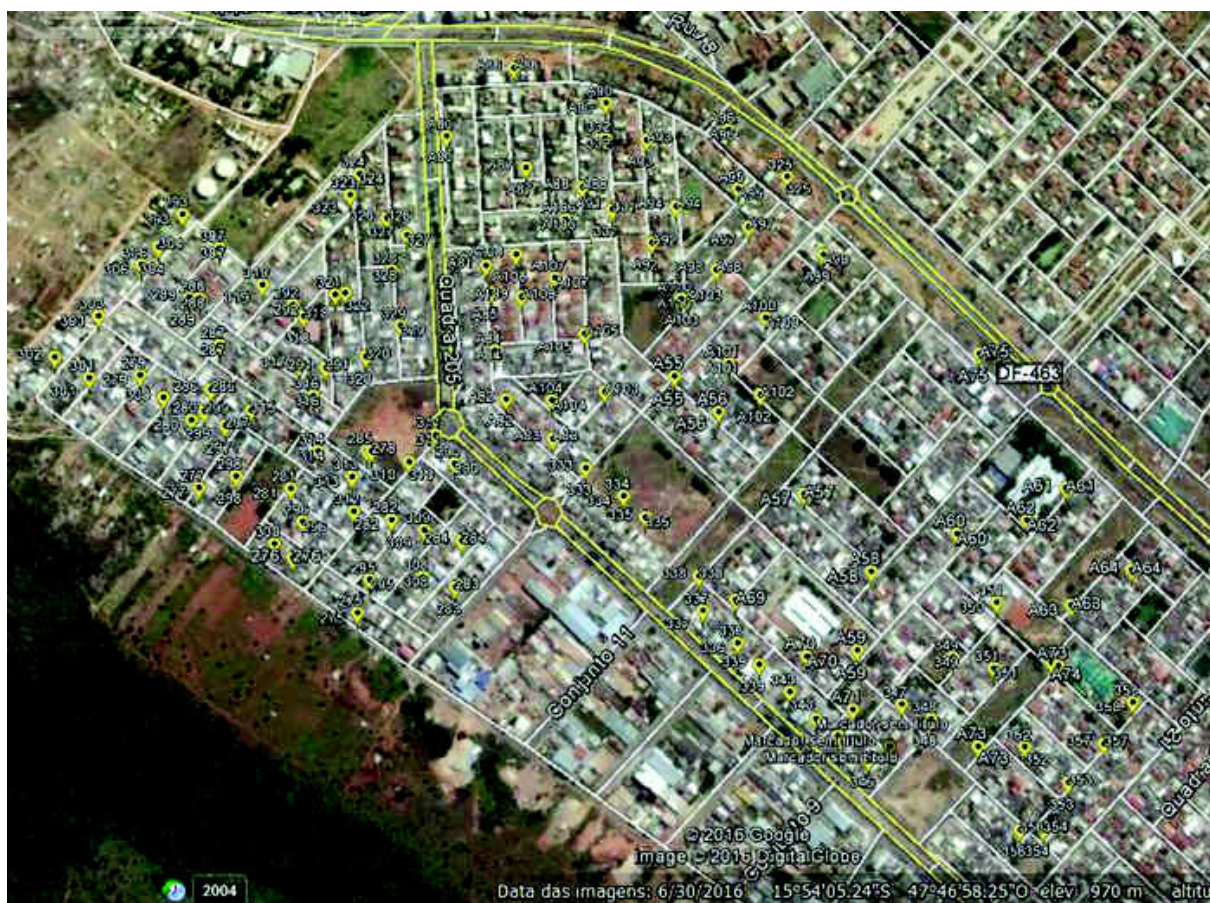


Figura 16 - Imagem de satélite mostrando a distribuição espacial dos locais (amarelo) de instalação de Estações Disseminadoras de PPF no Residencial Oeste (Área de intervenção-AI) em São Sebastião, DF.

Fonte: Modificado de Google Earth (2016).

As EDs consistem em um recipiente de plástico, formato arredondado, cor cinza, com capacidade máxima de 1,5L, medindo 11cm de altura, 15cm de diâmetro e 50cm de circunferência. A parte externa foi revestida por uma fita adesiva preta para torná-lo mais escuro. A parte interna foi coberta com tecido Oxford da cor preta e preso por elástico de borracha látex da cor amarela para maior aderência do PPF no momento da aplicação (Figura 17) (ABAD-FRANCH et al., 2015; ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017).

O PPF (Sumilarv 0.5 g, Sumitomo, Londres, Reino Unido) granulado passou pelo processo de micronização para ser utilizado, tornando-se um pó ultrafino e facilitando a disseminação realizada pelos mosquitos. O produto foi fornecido pelo pesquisador Sérgio Luz da Fiocruz – AM.



Figura 17 - Estação disseminadora (ED) com PPF usada como medida de intervenção para os mosquitos. A ED com água serve para atrair as fêmeas, o recipiente mais escuro e o tecido da cor preta, assemelha um local propício para a oviposição. As fêmeas pousam sobre o tecido com PPF, que subsequentemente realizam a auto-disseminação, transferem o PPF para possíveis locais de reprodução.

Fonte: O autor (2019).

Após o consentimento do morador (apêndice A e B), as EDs foram instaladas em locais de possível acesso aos mosquitos e era distribuído aproximadamente $5\text{g}/\text{m}^2$ de PPF no tecido com auxílio de um pincel, localizado na borda do recipiente e acima do nível da água (Figura 17). A manutenção foi realizada mensalmente considerando o efeito residual conhecido do produto, geralmente na terceira semana do mês, com reposição de 500-700ml de água da torneira e $5\text{g}/\text{m}^2$ PPF. Os recipientes extraviados foram substituídos durante a manutenção mensal das estações, que ocorreu no período de março de 2017 a março de 2018. Todas as EDs foram retiradas na segunda semana de abril de 2018, totalizando 13 meses de intervenção. Se não fosse possível encontrar o morador na primeira visita, a equipe retornava no dia seguinte. No caso de perda da estação devido a mudança, abandono da residência ou desistência do morador, a equipe instalava outra ED na

casa mais próxima, após autorização do responsável. Todos os moradores que participaram foram orientados a repor a água da ED de uma a duas vezes por semana, para mantê-la com água.

O método de intervenção mostrou ser eficaz e de fácil operacionalidade, outros fatores que destacam na aplicabilidade são a utilização de água como atrativo para as fêmeas, o recipiente mais escuro e o tecido da cor preta, assemelha um local propício para a oviposição e possui fácil instalação, manutenção e retirada (ABAD-FRANCH et al., 2015; ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017).

Esse estudo compõe o projeto intitulado “Zika, Dengue e Chikungunya: abordagem multidisciplinar para desenvolvimento de soluções aplicáveis em saúde pública” financiado pela FAP-DF. Não foi necessária autorização para realização da pesquisa por comitês de ética por não envolver seres humanos, conforme a resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde. Após a finalização das coletas em campo os resultados gerais foram apresentados como devolutiva à comunidade como um informativo (apêndice C).

3.9 ANÁLISE DE DADOS

3.9.1 Mosquitos aspirados

Os dados da quantidade de mosquitos (machos, fêmeas, por espécie), capturados nas casas ao longo dos 18 meses na área de intervenção e controle foram digitados em planilha Excel. O tempo de aspiração em cada casa também foi registrado e usado para calcular o número de mosquitos aspirados/10 minutos de aspiração. Dados da temperatura média e precipitação acumulada dos meses da amostragem foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia – INMET para a estação meteorológica de Brasília. A partir desses dados foram produzidos gráficos de quantidade de mosquitos aspirados ao longo dos 18 meses nas áreas de intervenção e controle. Nesses gráficos também foram incluídos valores de precipitação acumulada mensal para contrastar ambos os dados.

O número médio de mosquitos aspirados/10 minutos de aspiração nas casas antes, durante e após a intervenção foi calculado para todos os mosquitos e para cada espécie de mosquito, assim como o desvio padrão e erro padrão das médias. Os dados foram apresentados em gráficos para analisar de forma exploratória o

efeito da intervenção. Para comparar a média de mosquitos aspirados/10 minutos (*Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* e ambas as espécies) antes e durante a disseminação do PPF nos meses chuvosos (janeiro a março de 2017 e 2018) utilizamos o teste Wilcoxon para amostras dependentes. Para comparar a média de mosquitos aspirados/10 minutos (*Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* e ambas as espécies) durante a intervenção na áreas de intervenção e controle utilizamos o teste Mann-Whitney. Estes testes foram realizados utilizando o programa Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA), considerando $p < 0,05$. Para verificar se existia correlação entre o número médio de mosquitos aspirados e a precipitação mensal foi realizada uma correlação de Spearman. Além disso, o número médio de mosquitos aspirados/10 min aspiração nas casas durante o período chuvoso de 2017 (antes da intervenção) e 2018 (após a intervenção) foi comparado no intuito de diminuir a influência da temperatura e precipitação nas comparações de ocorrência de mosquitos na área.

3.9.2 Positividade de arbovírus nos mosquitos

Foi considerada variável dependente o número de pools positivos (com RNA viral detectado nos mosquitos) para Zika, dengue e chikungunya e as variáveis independentes a área (intervenção e controle), espécie de mosquito (*Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*), períodos de captura (seca, chuva) e anos de captura (2017 e 2018). Para comparar as proporções de pools de mosquitos positivos de acordo com as variáveis independentes acima descritas foram realizados testes Qui-quadrado ou teste exato de Fisher no software Graphpad, considerando $p < 0,05$. Para calcular os limites de confiança para proporções de pools de mosquitos que foram testados e de pools mosquitos positivos no período antes, durante e depois da intervenção nas duas áreas foi utilizado o site OpenEpi (Score Wilson).

4 RESULTADOS

4.1 QUANTIDADE DE MOSQUITOS

Por meio da aspiração foram coletados no total 4473 mosquitos entre janeiro de 2017 e junho de 2018 no Residencial Oeste (Área de Intervenção - AI) e no Residencial Bosque (Área Controle- AC). Desses, 832 indivíduos foram identificados como *Ae. aegypti* e 3641 como *Cx. quinquefasciatus*. Nos três primeiros meses, antes da instalação das EDs, a média de mosquitos capturados por 10 minutos de aspiração, foi 4,73 para a AI e 6,01 para a AC. Entretanto, durante a intervenção, com as EDs instaladas, uma média de 1,30 mosquitos coletados na AI e de 6,47 na AC foi observada, sendo 635 mosquitos coletados em uma única casa.

Nos últimos dois meses, após a retirada das EDs, foi obtida uma média de 1,45 mosquitos coletados na AC, enquanto na AI obteve-se uma média de 0,88 mosquitos coletados por 10 minutos de aspiração. Houve uma redução de 72,5% na quantidade desses mosquitos na AI durante a intervenção, enquanto na AC houve um aumento de 7,63% no mesmo período. Após 2 meses da retirada das EDs, notou-se uma redução de 81,2% na AI, no mesmo período na AC observou-se uma redução de 75,8% (Figura 18). As médias de mosquitos aspirados/10 minutos durante a intervenção na AI e AC foram estatisticamente diferentes (Mann-Whitney; $p < 0,001$).

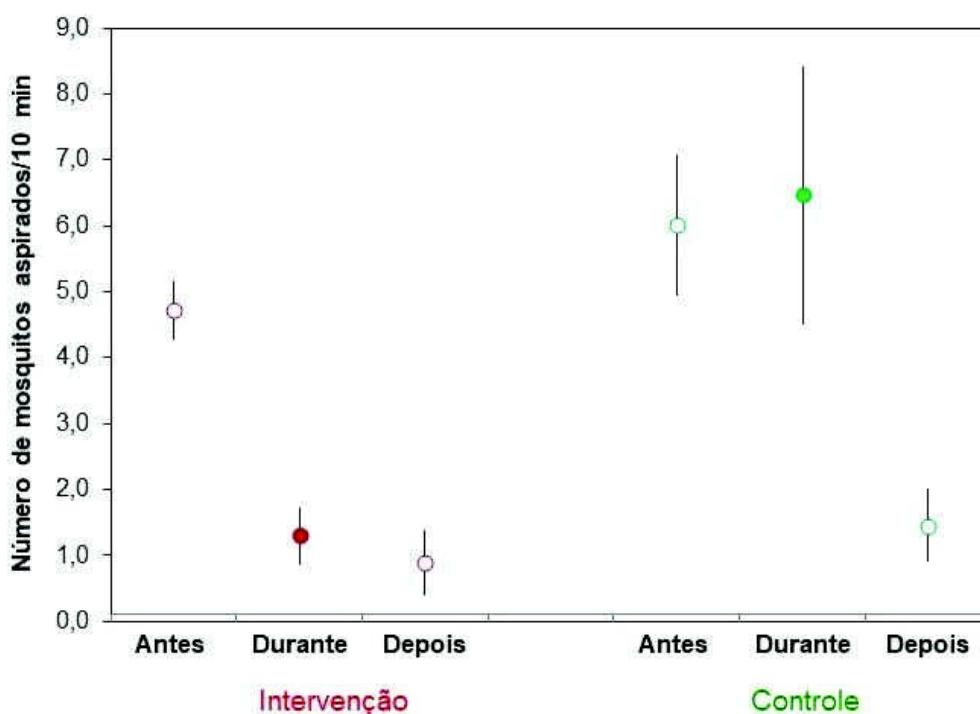


Figura 18 - Número de mosquitos aspirados (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*) a cada 10 minutos de aspiração. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.

Nos três primeiros meses, a média de mosquitos aspirados por 10 minutos para o *Ae. aegypti* na AI foi de 3,22. Durante o período de intervenção a média diminuiu para 0,50. Após a retirada das EDs, a média foi de 0,61 mosquitos capturados. Houve uma redução de 84,3% na média de mosquitos aspirados no período de intervenção em relação ao período inicial e uma redução ainda de 81% após 2 meses da retirada das EDs (Figura 19).

Na AC a média de *Ae. aegypti* aspirados nos três primeiros meses foi de 0,96. Posteriormente, simultaneamente ao período de intervenção na AI, verificou-se uma média de 0,51. Nos últimos 2 meses observou-se uma média de 0,38 mosquitos coletados. Registrou-se uma diminuição na média dos mosquitos aspirados na AC de 46,2%, no período de intervenção na AI, e de 60,4% nos últimos 2 meses de estudo, quando comparadas ao período inicial, antes da intervenção (Figura 19). As médias de mosquitos *Ae. aegypti* aspirados/10 minutos durante a intervenção na AI e AC não foram estatisticamente diferentes (Mann-Whitney; $p=0,32$) considerando

os 13 meses de disseminação do PPF (abril de 2017 a abril de 2018). Entretanto, ao comparar as médias de mosquitos *Ae. aegypti* aspirados/10 minutos durante a intervenção na AI e AC considerando os meses chuvosos (outubro de 2017 a março de 2018) foi observada diferença estatística (Mann-Whitney; $p=0,03$).

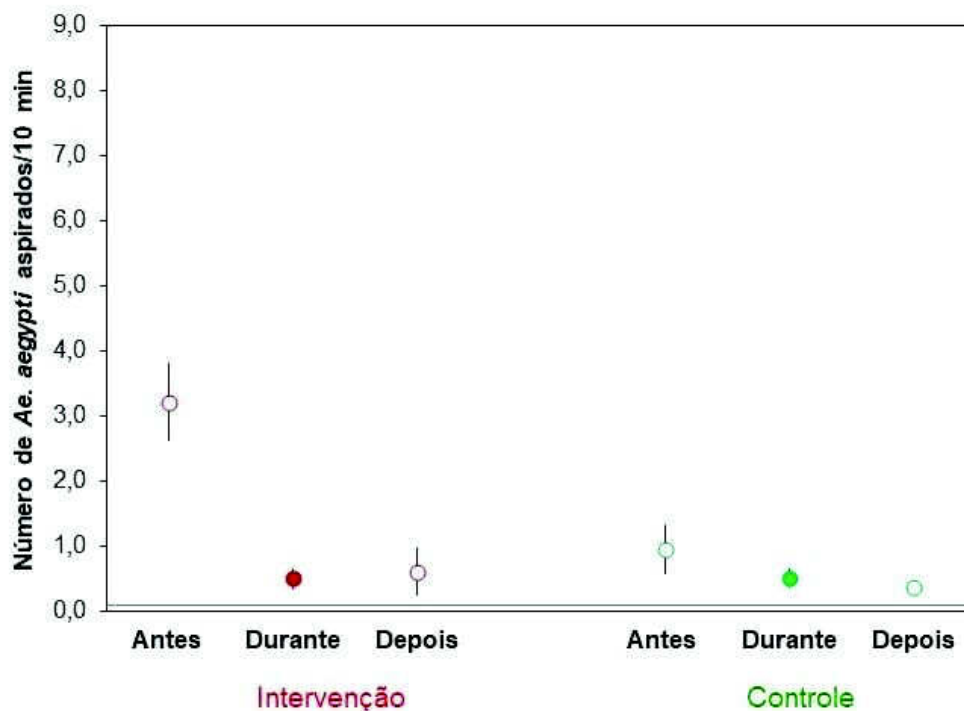


Figura 19 - Número de mosquitos *Aedes aegypti* coletado a cada 10 minutos de aspiração. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.

A média de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* aspirados por 10 minutos na AI nos três primeiros meses foi de 1,51, enquanto durante o período de intervenção foi de 0,80 e após esse período 0,27 mosquitos por 10 minutos de aspiração. Observa-se diminuição na quantidade dessa espécie de 47,3% no período de intervenção para 88,8% no período final (Figura 20).

Na AC foram coletados nos três primeiros meses uma média de 5,05 mosquitos, em seguida a média foi de 5,95 enquanto acontecia a intervenção na AI. Nos últimos dois meses obteve-se uma média de 1,07 mosquitos capturados. Verificou-se um aumento de 17,8% na quantidade desses mosquitos no período

concomitante à intervenção na AI, porém houve redução de 78,8% nos últimos 2 meses nessa área (Figura 20). As médias de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* aspirados/10 minutos durante a intervenção na AI e AC foram estatisticamente diferentes (Mann-Whitney; $p < 0,001$).

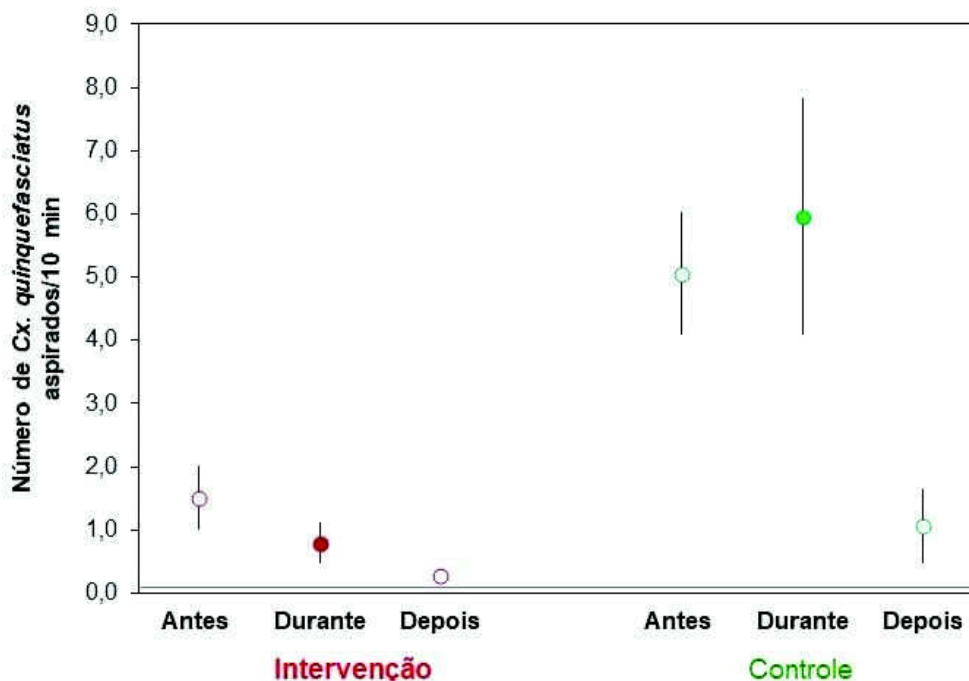


Figura 20 - Número de mosquitos *Culex quinquefasciatus* coletado a cada 10 minutos de aspiração. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.

Nos meses secos verificou-se menor quantidade de mosquitos (Figura 21). Apesar da maioria dos mosquitos ter sido capturada nos meses chuvosos, os valores de correlação entre quantidade de mosquitos e precipitação acumulada no mês em que foi realizada a aspiração na área de intervenção não foram significativos (*Ae. aegypti* = 0,46; *Cx. quinquefasciatus* = 0,41). Na área controle houve uma maior correlação entre quantidade de mosquitos e precipitação (*Ae. aegypti* = 0,77; *Cx. quinquefasciatus* = 0,50). De forma geral, observou-se evidente aumento na quantidade desses mosquitos nos períodos com maior precipitação, principalmente na AC (Figura 21).

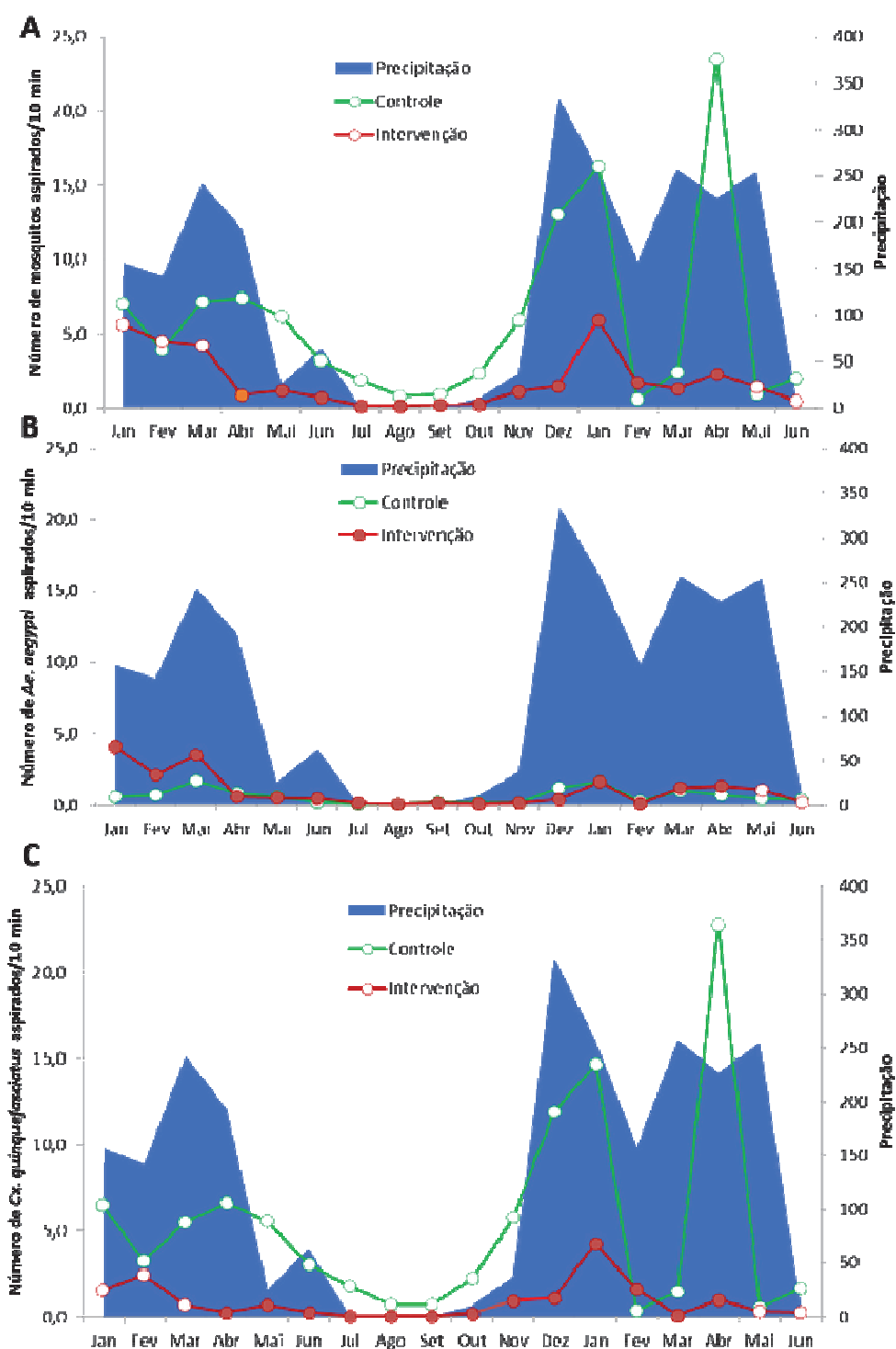


Figura 21 - Número de mosquitos aspirados por mês (janeiro de 2017 a junho de 2018), a curva vermelha representa a área de intervenção e a curva verde representa a área controle. Os picos em azul indicam a precipitação acumulada dos meses em que foi realizada a aspiração. A: número total de mosquitos (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*) capturados; B: número de mosquitos *Ae. aegypti* capturados; C: número de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* capturados.

Os níveis de precipitação dos meses chuvosos, antes da intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2017) e durante a intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2018) com EDs foram similares. Bem como, nota-se que os níveis de precipitação foram maiores nos meses chuvosos em 2018 (Figura 22).

Ademais, nesses meses antes e durante a intervenção foi observado o efeito da intervenção com EDs na quantidade desses mosquitos (Figura 23A). Contudo, esse efeito foi mais evidente na quantidade de *Ae. aegypti*, onde antes da intervenção a média de mosquitos aspirados foi 3,2, sendo que durante a intervenção foi de 0,95 na AI. Além disso, notou-se uma redução de 70,3% na quantidade de mosquitos *Ae. aegypti* durante a intervenção nesses meses chuvosos (Figura 23B).

Já na AC, as quantidades de mosquitos nos três primeiros meses sem intervenção e durante a intervenção foram similares, com uma média de 0,95 e 0,93 de mosquitos aspirados, respectivamente. Foi observada uma redução de 2,6% na quantidade de *Ae. aegypti* durante os meses chuvosos (Figura 23B).

Para *Cx. quinquefasciatus*, a média antes da intervenção era de aproximadamente 1,5 mosquitos aspirados/10 min e durante a intervenção passou a ser de 0,87 na AI. Notou-se uma redução de 42% na quantidade desses mosquitos nesses períodos na AI. Contudo, não houve diferença entre a quantidade *Cx. quinquefasciatus* antes e durante a intervenção na AC (Figura 23C).

As médias de mosquitos aspirados/10 minutos antes e durante a intervenção nos meses chuvosos na AI foram estatisticamente diferentes para ambas as espécies de mosquitos (Wilcoxon; $p=0,005$) e para *Ae. aegypti* (Wilcoxon; $p=0,003$). Porém, não foram estatisticamente diferentes para *Cx. quinquefasciatus* (Wilcoxon; $p=0,08$) nesse período.

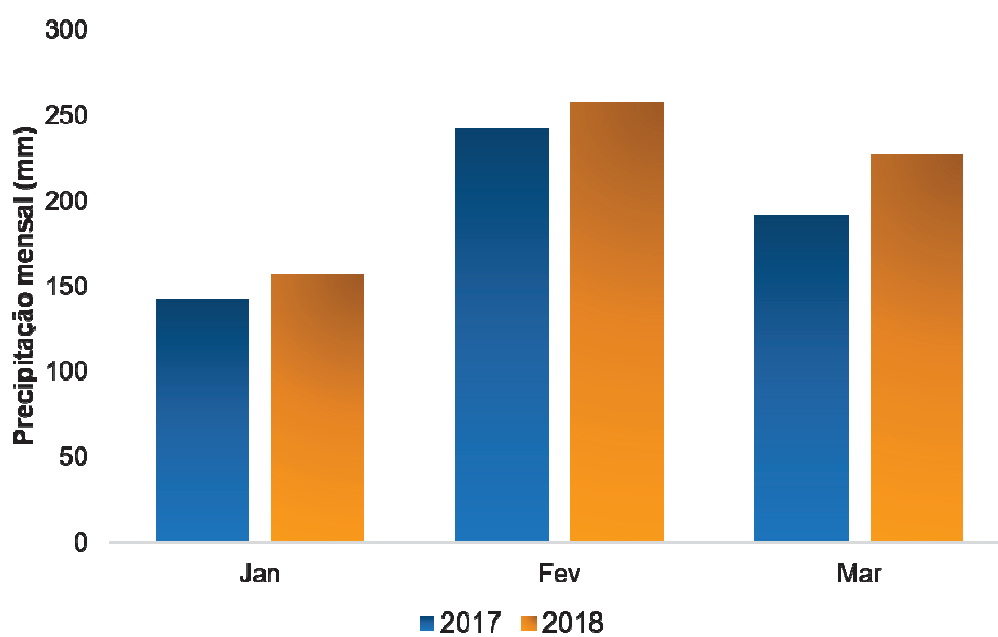


Figura 22 - Precipitação mensal dos meses chuvosos, antes da intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2017) e durante a intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2018) com estações disseminadoras de piriproxifeno.

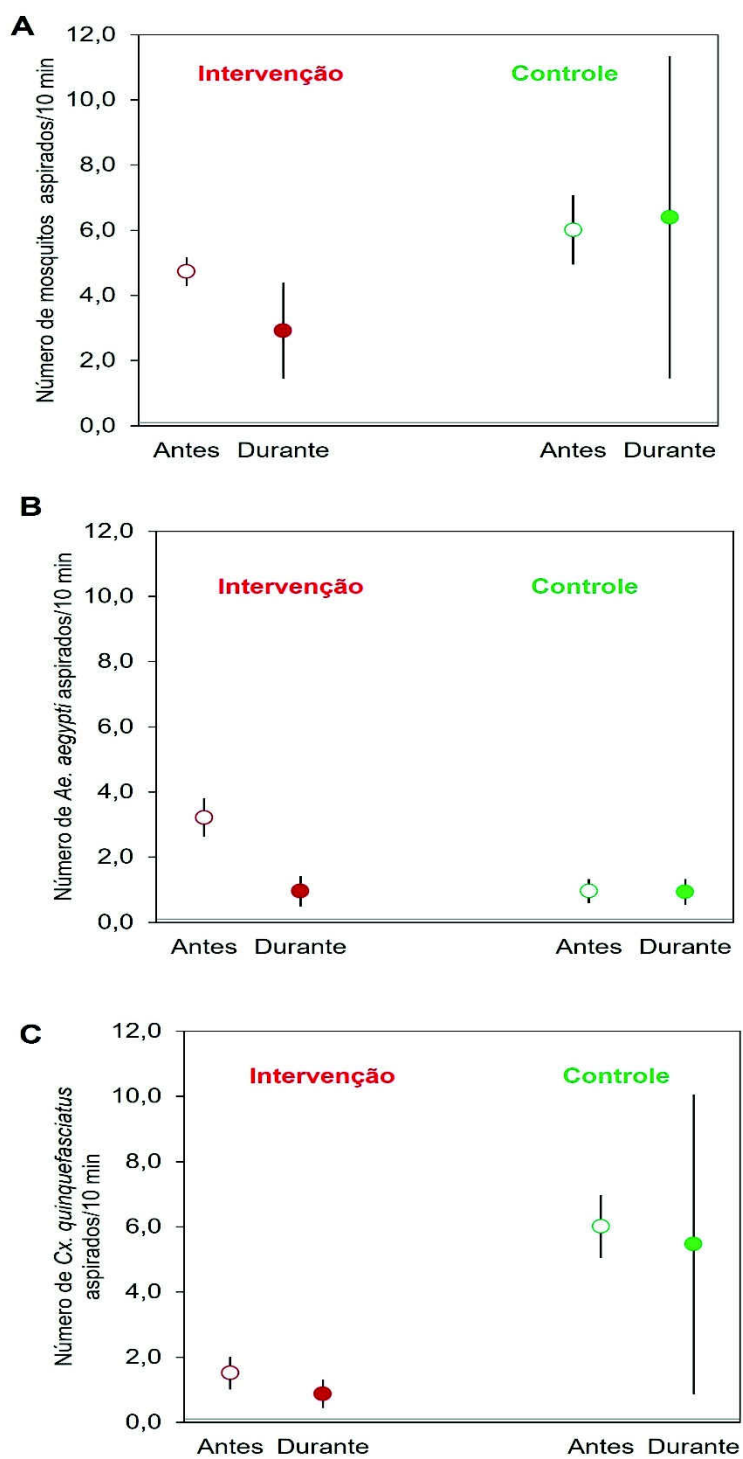


Figura 23 - Número de mosquitos aspirados nos meses chuvosos, antes da intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2017) e durante a intervenção (janeiro, fevereiro e março de 2018) nas áreas estudo. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI. A: número total de mosquitos (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*) capturados; B: número de mosquitos *Ae. aegypti* capturados; C: número de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* capturados.

4.2 DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS NOS MOSQUITOS

Dos mosquitos aspirados na AC e na AI, foram identificadas 371 fêmeas de *Ae. aegypti*, que foram agrupadas em 192 pools e analisadas quanto a infecção para os vírus DENV, ZIKV e CHIKV. De todas as amostras testadas, 4 pools apresentaram resultados positivos, dos quais 2 (50%) pools foram positivos para os três arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV, sendo proveniente de uma fêmea capturada em abril de 2017 e a outra em janeiro de 2018. Além disso, 1 (25%) pool foi positivo para ambos DENV, proveniente de uma fêmea capturada em abril de 2018. Por fim, 1 (25%) pool foi positivo para ZIKV, sendo proveniente de fêmeas capturadas em janeiro de 2017. Dessa forma, as amostras compatíveis com o *Cycle Threshold* (Ct) até 35 foram consideradas positivas (Figuras 24 e Tabela 1).

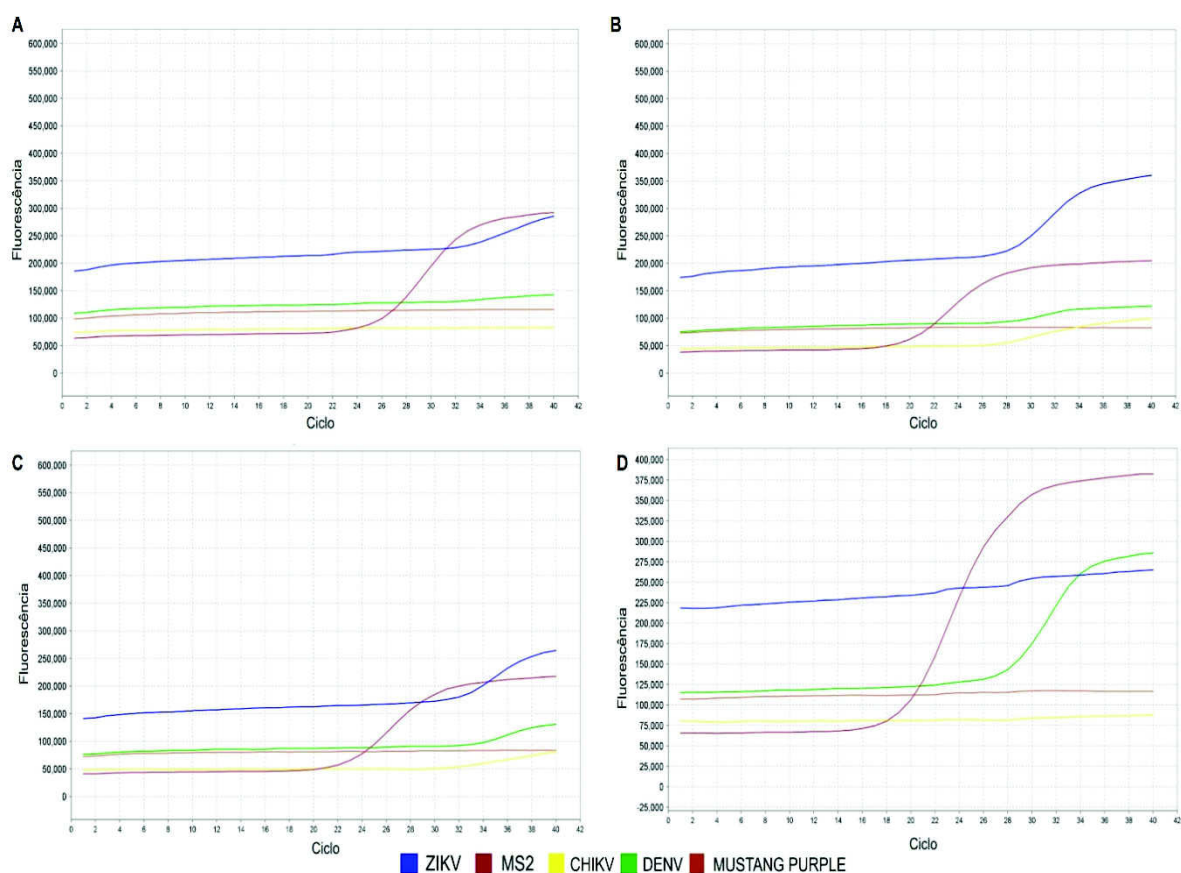


Figura 24 - Resultados da RT-qPCR em tempo real das amostras de *Aedes aegypti* positivas para os vírus que causam dengue, Zika e chikungunya, controle interno de toda a reação (FAGO MS2) e o corante de referência passiva (MUSTANG PURPLE). A: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 11 positiva para ZIKV. B: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 79 positiva para DENV, ZIKV e CHIKV. C: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 145 positiva para DENV, ZIKV e CHIKV. D: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 179 positiva para DENV.

Tabela 1 - Distribuição dos pools de fêmeas *Aedes aegypti* positivos para os vírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados por mês e as áreas de estudo (Residencial Bosque-AC e Residencial Oeste-AI) em São Sebastião-DF, janeiro de 2017 a maio de 2018.

<i>Aedes aegypti</i>						
Número	Mês/ano	Número de fêmeas em cada amostra	Resultado qRT-PCR			
			DENV	ZIKV	CHIKV	
11	Janeiro/2017	3	-	+	-	
79	Abril/2017	1	+	+	+	
145	Janeiro/2018	1	+	+	+	
179	Abril/2018	1	+	-	-	

Dos mosquitos aspirados foram identificadas 1875 fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, totalizando 320 pools analisados pela RT-qPCR *multiplex*. Destes 58 pools apresentaram resultados positivos, os quais 40 (68,96%) foram positivos apenas para ZIKV, sendo que 29 foram capturados na AC em janeiro (n=2), março (n=1), outubro (n=1), novembro (n=1) e dezembro (n=6) de 2017; janeiro (n=4), fevereiro (n=3), março (n=1), abril (n=2), maio (n=2), junho (n=6) de 2018. Os outros 11 pools positivos para ZIKV foram coletados na AI em fevereiro (n=2), maio (n=1), outubro (n=1), novembro (n=2), dezembro (n=3) de 2017; março (n=1), abril (n=1) de 2018.

Dos 18 pools restantes, 17 (29,31%) foram positivos para DENV e ZIKV, sendo que 11 foram coletados na AC em março (n=2), abril (n=1) de 2017, março (n=2), abril (n=2), maio (n=2) e junho (n=2) de 2018 e na AI em fevereiro (n=1), julho (n=1) de 2017, abril (n=1), maio (n=2) e junho (n=1) de 2018. Houve ainda 1 pool (1,72%) positivo para DENV, ZIKV e CHIKV, capturado na AC em dezembro de 2017 (Figura 25 e tabela 2).

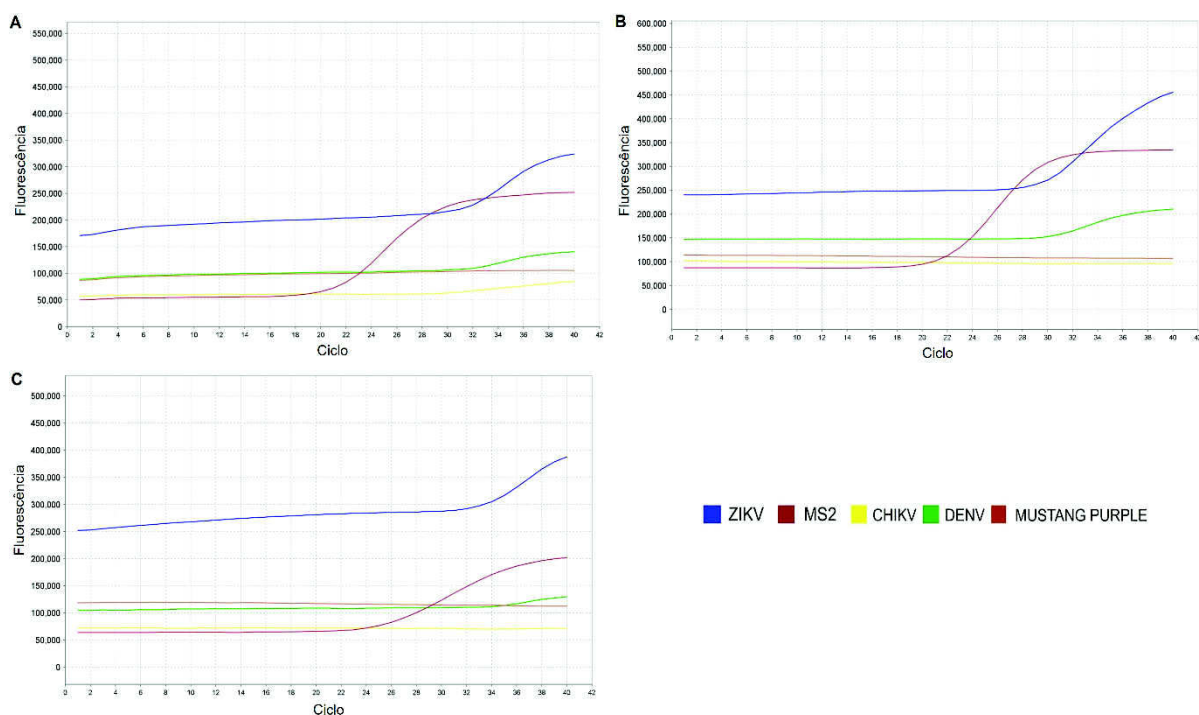


Figura 25 - Resultados da RT-qPCR em tempo real das amostras de *Culex quinquefasciatus* positivas para os vírus que causam dengue, Zika e chikungunya, controle interno de toda a reação (FAGO MS2) e o corante de referência passiva (MUSTANG PURPLE). A: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 415 positiva para DENV, ZIKV e CHIKV. B: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 516 positiva para DENV e ZIKV. C: Representação gráfica da curva de amplificação da amostra 448 positiva para ZIKV.

Tabela 2 - Distribuição dos pools de fêmeas *Culex quinquefasciatus* positivos para os vírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados por mês e as áreas de estudo (Residencial Bosque-AC e Residencial Oeste-AI) em São Sebastião-DF, janeiro de 2017 a maio de 2018.

<i>Culex quinquefasciatus</i>					
Número	Mês/ano	Número de fêmeas em cada amostra	Resultado qRT-PCR		
			DENV	ZIKV	CHIKV
208	Janeiro/2017	7	-	+	-
227	Janeiro/2017	2	-	+	-
246	Fevereiro/2017	1	-	+	-
248	Fevereiro/2017	1	-	+	-
250	Fevereiro/2017	1	+	+	-
262	Março/2017	2	-	+	-
268	Março/2017	1	+	+	-
269	Março/2017	3	+	+	-
283	Abril/2017	1	+	+	-
326	Mai/2017	1	-	+	-
356	Julho/2017	1	+	+	-
371	Outubro/2018	1	-	+	-
377	Outubro/2018	1	-	+	-
380	Outubro/2017	1	-	+	-
392	Novembro/2017	1	-	+	-
395	Novembro/2017	1	-	+	-
397	Dezembro/2017	2	-	+	-
400	Dezembro/2017	2	-	+	-
401	Dezembro/2017	5	-	+	-
402	Dezembro/2017	2	-	+	-
410	Dezembro/2017	1	-	+	-
413	Dezembro/2017	8	-	+	-
415	Dezembro/2017	1	+	+	+
417	Dezembro/2017	1	-	+	-
428	Dezembro/2017	2	-	+	-
429	Dezembro/2017	1	-	+	-
434	Janeiro/2018	2	-	+	-
440	Janeiro/2018	5	-	+	-
448	Janeiro/2018	2	-	+	-
451	Janeiro/2018	1	-	+	-
464	Fevereiro/2018	4	-	+	-
469	Fevereiro/2018	1	-	+	-
470	Fevereiro/2018	1	-	+	-
482	Março/2018	1	-	+	-
483	Março/2018	1	+	+	-
484	Março/2018	1	+	+	-
490	Março/2018	1	-	+	-
491	Abril/2018	1	-	+	-
492	Abril/2018	3	+	+	-
493	Abril/2018	1	+	+	-
501	Abril/2018	10	-	+	-
503	Abril/2018	1	+	+	-
509	Abril/2018	1	-	+	-
511	Mai/2018	1	-	+	-
512	Mai/2018	2	+	+	-
513	Mai/2018	4	-	+	-
514	Mai/2018	3	+	+	-
516	Mai/2018	2	+	+	-
517	Mai/2018	2	+	+	-
518	Junho/2018	1	-	+	-
519	Junho/2018	2	-	+	-
520	Junho/2018	1	+	+	-
522	Junho/2018	2	-	+	-
523	Junho/2018	1	-	+	-
524	Junho/2018	1	+	+	-
525	Junho/2018	1	-	+	-
527	Junho/2018	2	-	+	-
528	Junho/2018	1	+	+	-

Na figura 26, comparam-se os resultados obtidos da distribuição dos pools de mosquitos positivos para cada arbovírus. Dos pools de *Ae. aegypti*, 2% (n=3) apresentaram resultados positivos DENV, 2% (n=4) foram positivos para ZIKV e 1% (n=2) foram positivos para CHIKV. Dos pools de *Cx. quinquefasciatus*, 6% (n=18) apresentaram positividade para o DENV, 18% (n=58) foram positivos para ZIKV e 0,31% (n=1) foram positivos para o CHIKV.

O percentual de positividade dos pools para DENV foi significativamente maior para *Cx. quinquefasciatus* (P= 0,0440) (Figura 26). Quando avaliada a positividade para CHIKV, o valor foi proporcionalmente maior para *Ae. aegypti* quando comparado a *Cx. quinquefasciatus*, mas não foi estatisticamente significativo (P= 0,5593). Já em relação ao ZIKV, a positividade foi significativamente maior em *Cx. quinquefasciatus* em relação a *Ae. aegypti* (P=0,0001).

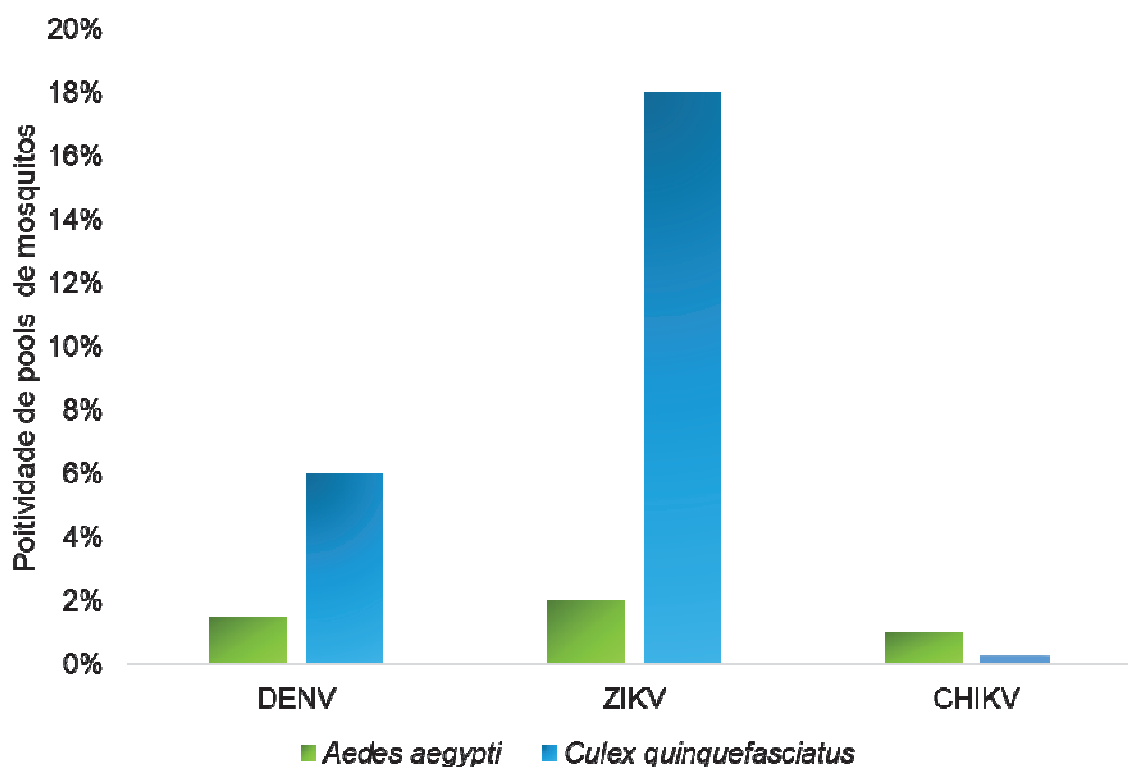


Figura 26 - Distribuição da frequência de pools positivos de mosquitos para cada arbovírus.

Na figura 27, podemos observar a distribuição de pools de mosquitos positivos para dois ou mais arbovírus. Dos pools de *Ae. aegypti*, nenhum apresentou positividade para DENV/ZIKV, DENV/CHIKV e ZIKV/CHIKV, mas dois (1,04%) foram

positivos para os três arbovírus DENV/ZIKV/CHIKV. Dos pools de *Cx. quinquefasciatus*, nenhum apresentou positividade para DENV/CHIKV e ZIKV/CHIKV, sendo que dezoito (6%) foram positivos para DENV/ZIKV, e um (0,31%) para DENV/ZIKV/CHIKV.

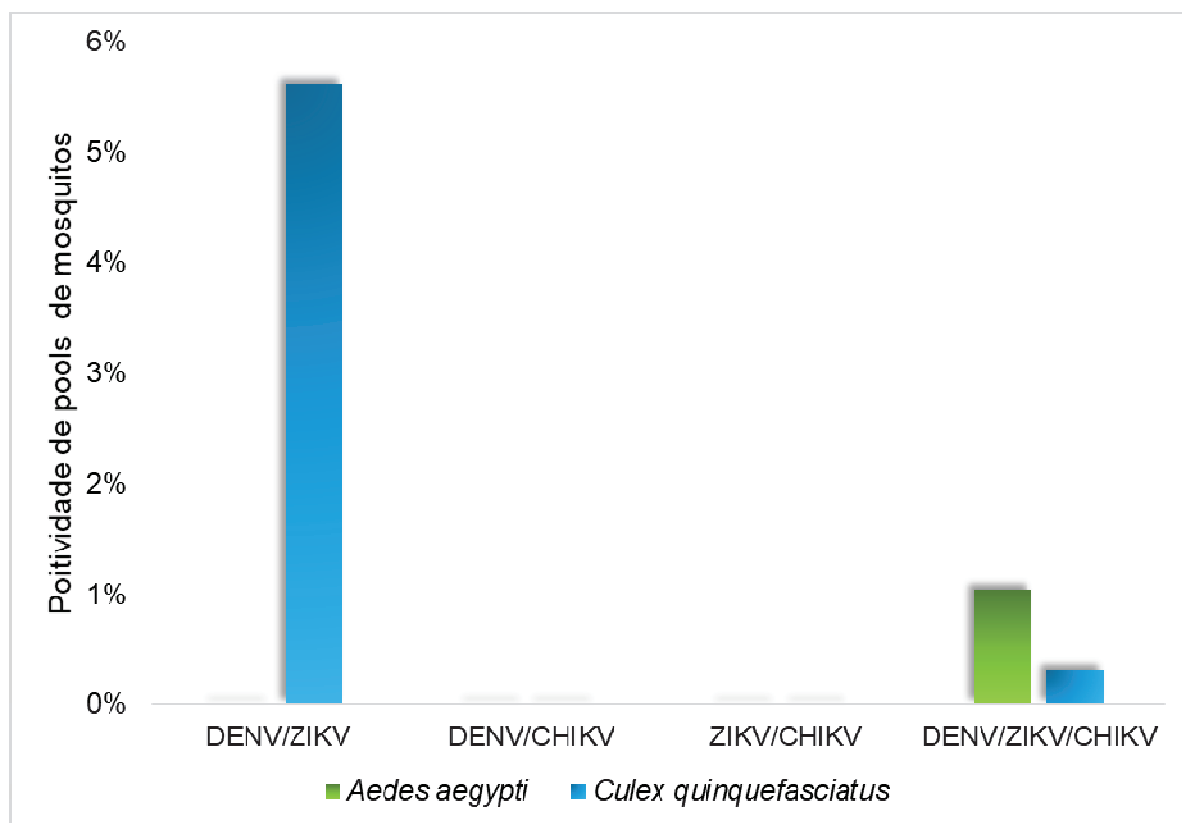


Figura 27 - Distribuição da frequência de pools positivos de mosquitos para dois ou mais arbovírus.

A proporção de pools positivos para arbovírus em relação ao total de pools testados foi de 12%. Essa proporção variou ao longo do período do estudo e apresentou valores diferentes quando comparadas as AC e AI. Antes da intervenção na AC a proporção foi de 6%, enquanto na AI foi de 7%. Durante a intervenção na AC a proporção foi de 11%, enquanto na AI elevou para 12%. Após o período de intervenção a proporção foi de 50% na AC, enquanto que na AI obteve-se uma proporção de 23% (Figura 28).

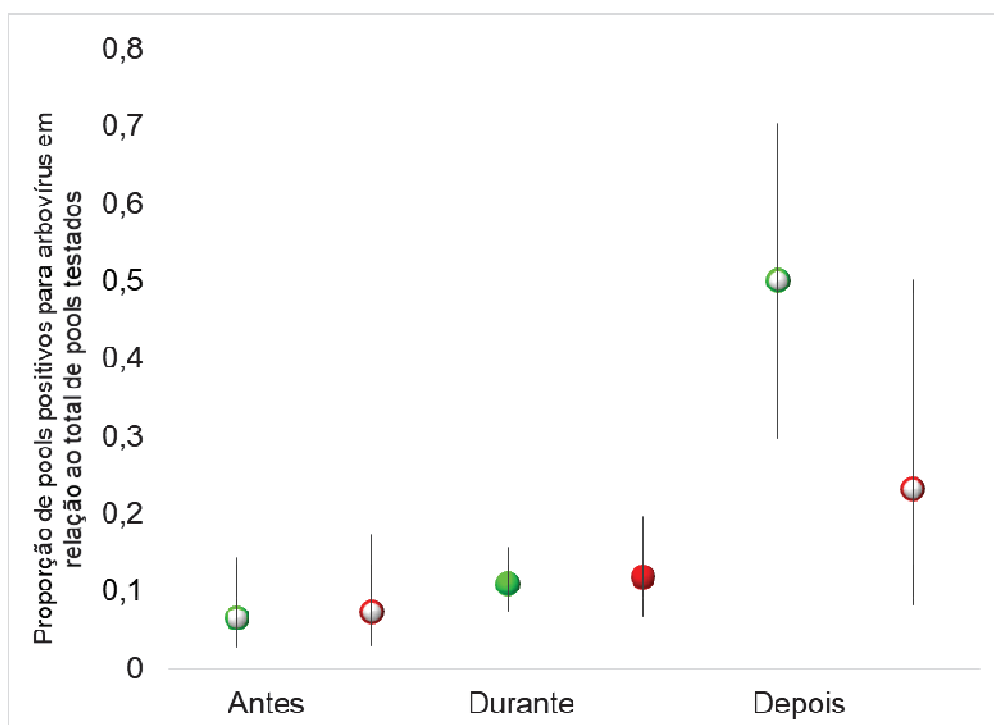


Figura 28 - Proporção de pools positivos para arbovírus em relação ao total de pools testados. Antes (janeiro a março de 2017), durante (abril de 2017 a abril de 2018) e depois (maio a junho de 2018) da intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção (vermelho) e área controle (verde) em São Sebastião-DF. Os círculos indicam as médias e as linhas o erro padrão. O círculo preenchido indica o período de intervenção na AI.

A proporção dos pools positivos para arbovírus em relação ao total de pools testados nos períodos sem a presença do piriproxifeno (na AC no período antes, durante e após intervenção e na AI antes da intervenção) foi de 12%. Já na AI no período durante e após a intervenção a proporção foi de 13% (Figura 29). No apêndice C estão sumarizados os resultados positivos para ambas as espécies de mosquitos analisados neste estudo.

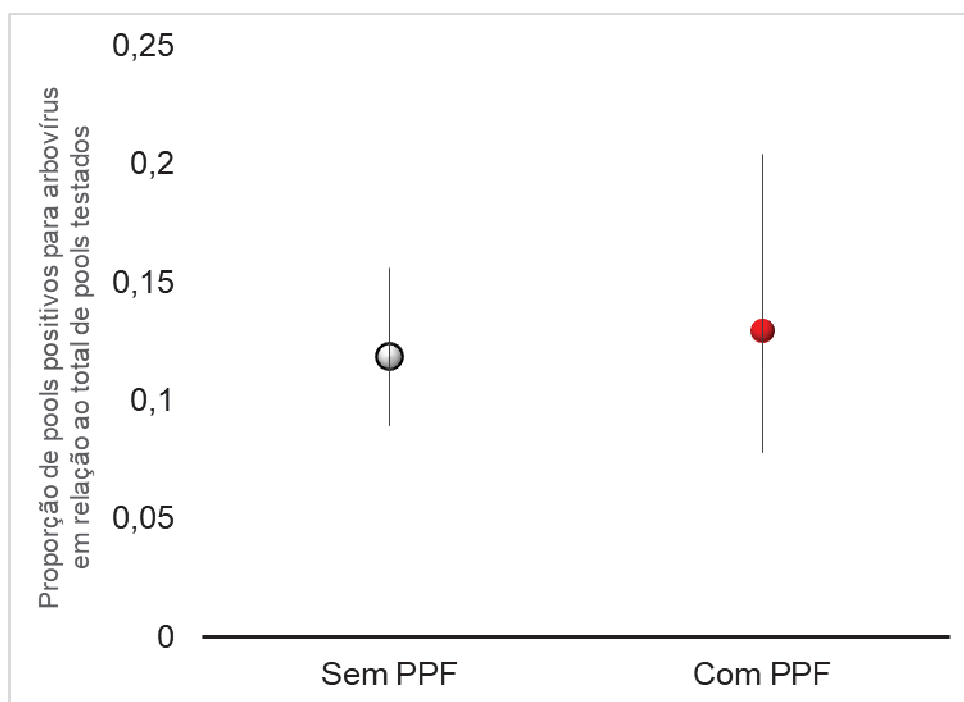


Figura 29 - Proporção de pools positivos para arbovírus em relação ao total de pools testados nos períodos com e sem intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno na área de intervenção e área controle em São Sebastião. O círculo preenchido indica a presença de piriproxifeno.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta evidências importantes sobre os efeitos de estações disseminadoras de PPF na quantidade de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em uma área urbana de clima tropical. O uso das EDs com o inseticida indicou redução na quantidade desses mosquitos, principalmente *Ae. aegypti* na área de intervenção em São Sebastião- DF. Esse larvicida tem sido utilizado em baixas concentrações no controle de criadouros de *Ae. aegypti* pelos agentes de saúde por orientação do Ministério da Saúde, demonstrando ser um produto economicamente viável e eficaz para o controle de vetores (BRASIL, 2014b). Os dados do presente estudo reforçam estudos prévios (ABAD-FRANCH et al., 2015; ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017) indicando que PPF disseminado por mosquito é uma boa alternativa que poderia ser adicionada às estratégias já existentes de controle de mosquitos.

O controle desses mosquitos a princípio depende da destruição e tratamento de seus criadouros, os quais muitas vezes não são detectados pelos agentes de saúde, sendo considerados crípticos. Nesse estudo, a metodologia aplicada como estratégia de controle, utilizando os próprios mosquitos adultos para disseminar o PPF, aproveita o comportamento dos mosquitos em detectar esses criadouros crípticos. No momento da oviposição, o mosquito com PPF aderido ao seu corpo entra em contato com a superfície do recipiente, contaminando o habitat aquático onde o inseticida vai agir no desenvolvimento das larvas dos mosquitos. Essa técnica permite o alcance de criadouros que são difíceis de detectar ou inacessíveis pelos Agentes, como por exemplo, prédios fechados e residências desocupadas. Além disso, evita o excesso de inseticidas e abrange o tratamento de locais de reprodução reduzindo a emergência de mosquitos adultos, tendo alta cobertura especialmente onde os métodos de controle convencionais e acesso humano são limitados.

Nesse estudo, utilização da intervenção com as estações disseminadoras de PPF demonstrou redução na quantidade de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Na AI, durante o período de disseminação do PPF, obteve-se redução de 72,5% na quantidade desses mosquitos, com maior efeito para *Ae. aegypti*. Resultados similares foram obtidos por Abad-Franch et al., (2015) e Abad-

Franch, Zamora-Perea & Luz, (2017). O primeiro estudo realizado em Manaus-AM, após período de 4 meses de intervenção observou-se o aumento nas taxas de mortalidade juvenil dos mosquitos em aproximadamente 75%. O mesmo estudo sugere que a disseminação realizada pela espécie *Ae. aegypti* pode ser mais eficiente do que a realizada por *Cx. quinquefasciatus*. No segundo estudo, em Manacapuru-AM, no período de 8 meses de intervenção, notou-se redução de 79% a 92% na detecção de larvas e emergência dos mosquitos *Aedes*, enquanto descreceu de 96% a 98%. Dessa forma, observou que a emergência adulta de *Aedes* reduziu de 96% a 98%. Em ambos estudos citados acima, o efeito do PPF foi estimado avaliando a emergência de adultos em criadouros sentinelas/larvitampas, diferindo deste trabalho onde analisou o efeito do produto na quantidade de mosquitos adultos no ambiente urbano.

No presente estudo, no último mês do período de intervenção (abril de 2018) foi observado um aumento (7,63%) na quantidade desses vetores na área controle, principalmente dos mosquitos *Cx. quinquefasciatus* aspirados. Posteriormente, após 2 meses da retirada das EDs, notou-se uma redução de 78,8% na quantidade desses mosquitos na AC. Entretanto, nas duas áreas de estudo houve uma redução significativa das duas espécies de mosquitos vetores, mesmo após a retirada das EDs. Estudos realizados na Amazônia apresentaram dados relevantes do uso das EDs com PPF, comprovando que a disseminação realizada pelos mosquitos proporcionou alta cobertura nos locais de reprodução em escala de bairro (ABAD-FRANCH et al., 2015) e cidade (ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017), reduzindo as populações desses vetores. Em escala de bairro, demonstraram que os mosquitos podiam disseminar partículas do inseticida para habitats larvais a distâncias entre 3 a 400 metros (ABAD-FRANCH et al., 2015).

A aspiração de mosquitos adultos como monitoramento entomológico demonstrou alta frequência de mosquitos nas áreas de estudos. A quantidade de mosquitos coletados em cada bairro foi diferente entre as espécies. Foi observado ao longo do estudo que a presença de *Ae. aegypti* foi maior na AI e *Cx. quinquefasciatus* na AC. Essa é uma variável importante para a eficácia da disseminação, que depende da quantidade de mosquitos adultos no ambiente para dispersar o produto (SUMAN et al., 2018). As fêmeas de *Ae. aegypti* são capazes de

visitar vários criadouros em uma única postura, por conseguinte reproduzindo em diversos locais pequenos e de difícil acesso (crípticos), servindo como refúgio de métodos de controle convencionais (MAINS, BRELSFOARD & DOBSON, 2015; ABAD-FRANCH et al., 2015; ABAD-FRANCH, ZAMORA-PEREA & LUZ, 2017; UNLU et al., 2017).

No presente estudo, a quantidade de mosquitos adultos obtida em cada área pode estar relacionada às diferentes características ambientais e climáticas. O monitoramento entomológico apresentou valores consideráveis nos períodos com maior precipitação, principalmente na AC. Nos meses com maiores picos de precipitação pluviométrica, antes (janeiro a março de 2017) e durante a intervenção (janeiro a março de 2018), indicando o efeito da intervenção com EDs na quantidade de mosquitos coletados, especialmente no número de *Ae. aegypti* capturados na AI. Contudo, o estudo realizado por David, Ribeiro e De Freitas (2012), demonstrou que a temperatura e as chuvas não influenciaram diretamente na quantidade dos mosquitos *Cx. quinquefasciatus* coletados no Rio de Janeiro. Posteriormente, os autores concluíram que biologia populacional dessa espécie variou de acordo com as características do ambiente em que foram coletados, indicado um desafio para os métodos de controle desse mosquito. Em outro estudo, essas duas espécies de mosquitos foram coletadas durante todos os meses em outro estudo realizado em campo. *Cx. quinquefasciatus* foi coletado em maior número nos meses de estação seca e em menor quantidade nos períodos que constavam alta precipitação pluviométrica. Entretanto, *Ae. aegypti* foi coletado em maior número em períodos chuvosos, mantendo condições ideais para reprodução desse vetor. Apesar disso, a temperatura e as condições pluviométricas da região não influenciaram diretamente o índice de infestação dessa espécie (COSTA & CALADO, 2016). Em condições climáticas variáveis em campo, a dispersão do PPF não foi comprometida, sendo eficaz na contaminação dos criadouros em até 200 metros de distância (SUMAN et al., 2018). Essa estratégia de controle pode ser adequada para a espécie *Ae. aegypti* nos períodos de seca, pois a falta de chuva compromete a disponibilidade de locais de reprodução e pode aumentar a dispersão das fêmeas a procura de reservatórios para ovipor (SOARES et al., 2015), assim contribuindo para disseminação do PPF.

De acordo com dados fornecidos pela Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde do Distrito Federal (DIVAL), houve aplicação de inseticidas UBV nas quadras/bairros de São Sebastião em que se realizou esse estudo. Em alguns momentos a pulverização foi realizada na AC e/ou AI coincidindo com as datas da aspiração dos mosquitos nesses bairros. Dessa forma é possível sugerir que este tenha contribuído para redução dos mosquitos nas áreas de estudo, especialmente na AI. O Ministério da Saúde recomenda que a pulverização de adulticidas químicos seja realizada apenas em períodos de surtos ou epidemias de dengue para o controle de *Ae. aegypti* (BRASIL, 2009). Tais efeitos são relevantes na redução imediata de populações adultas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Assim, esse método pode ser utilizado como parte de um programa integrado no controle vetorial (ESU et al., 2010; ZHANG, DORR & HEWITT, 2015; MARINI et al., 2019).

Devido a presença constante desses mosquitos nas residências, acredita-se que os moradores usavam inseticidas regularmente. O uso desses produtos tornou-se um hábito comum para os moradores de áreas urbanas, devido a presença de insetos hematófagos (DE OLIVEIRA et al., 2015). No Distrito Federal, mais de 60% dos casos envolvendo intoxicação por agrotóxicos ocorreram com inseticidas domésticos com princípio ativo piretróide, principalmente em acidentes com produtos contendo cipermetrina ou deltametrina (REBELO et al., 2011). Porém, os mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* têm desenvolvido mecanismos de resistência a inseticidas formulados com essas e outras substâncias (YADOULÉTON et al., 2015; MOYES et al., 2017), resultando no uso indiscriminado desses inseticidas e conseqüentemente aumentando os casos de intoxicação.

Em relação as características das áreas de estudo, as duas regiões residenciais possuem vegetação nativa próxima, além de casas em construção e lotes vazios. Devido a crise hídrica por longos períodos em algumas regiões de São Sebastião, os moradores possuem o hábito de acumular de água em grandes recipientes, como caixas d'água, dentro e fora das residências. A maioria dos imóveis apresentavam entulhos, cobertura vegetal e cisternas no quintal. Essas características favorecem condições suscetíveis a formação de criadouros para os mosquitos, como relatado por Forattini e Brito (2003) e Valença et al. (2013). As exigências ecológicas para *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* são diferentes,

apesar disso, ambas as espécies apresentam alta adaptabilidade biológica, possibilitando a coexistência nos mesmos locais de reprodução (SANTANA-MARTÍNEZ, MOLINA & DUSSÁN, 2017).

Nesse contexto, a equipe desse projeto analisou o perfil socioeconômico dos moradores, a frequência dos possíveis criadouros de *Ae. aegypti* e as características da construção dos imóveis na AC e na AI. Estes resultados demonstram a similaridade de criadouros em ambas as áreas, bem como uma homogeneidade em seus perfis socioeconômicos e de construção das moradias (ARAÚJO et al., 2018).

Durante a realização do estudo, todos os moradores que participaram foram orientados a repor a água da ED de uma a duas vezes por semana, para mantê-la com água. Entretanto, houve de perda da estação devido a mudança, abandono da residência ou desistência do morador, outras estavam sem água e até inutilizáveis. A manutenção das EDs requer gastos com transporte para a equipe, reposição do larvicida, tempo e mão de obra com equipe treinada e colaboração dos moradores para manter a estação ativa o restante do mês. A participação da comunidade em programas de controle vetorial é importante para a sucesso da realização das metodologias. A manutenção das EDs foi realizada mensalmente considerando o efeito residual do PPF entre 8 a 12 semanas (Brasil, 2014b; SUMAN et al., 2018), obtendo bom desempenho em condições de campo. Dessa forma, o estudo tentou apresentar uma rotina similar a dos programas de controle vetorial realizados pelos agentes. Porém, Abad-Franch et al. (2015) e Abad-Franch, Zamora-Perea e Luz (2017) realizam estudo com EDs com capacidade de dois litros e realizaram manutenção quinzenal, essas características são importantes principalmente em ambiente com baixa umidade como o Distrito Federal em períodos de seca e manutenção espaçadas.

O monitoramento entomológico constatou a evidente redução na quantidade dos mosquitos adultos pelas estações disseminadoras de piriproxifeno. Apesar disso, ao longo do estudo não foi possível comprovar a efetividade do PPF em outros criadouros e o fluxo de mosquitos entre os bairros de São Sebastião. Esse trabalho faz parte de um estudo mais amplo que inclui outros objetivos que ainda estão sendo analisados, considerando o efeito de todos os possíveis fatores que

influenciaram na quantidade de mosquitos adultos coletados nas áreas de estudo, por exemplo, fatores climáticos e uso do UBV.

No presente estudo, a multiplex RT-qPCR foi capaz de detectar o DENV, ZIKV e CHIKV em quatro amostras de *Ae. aegypti*. Portanto, 50% apresentaram positividade simultânea para os três arbovírus, 25% detectaram tanto DENV quanto CHIKV e 25% apresentou positividade apenas para ZIKV. A circulação simultânea dupla ou tripla desses arbovírus em humanos são frequentemente relatadas em regiões endêmicas (CARDOSO et al., 2015; AZEREDO et al., 2018).

Rückert et al. (2017) infectaram mosquitos *Ae. aegypti* com os vírus CHIKV, DENV-2 e ZIKV individualmente, em dupla e tripla infecção e demonstraram que essa espécie é capaz de co-transmitir todos os pares de vírus, tal como os três arbovírus em conjunto. Observou-se também que essa co-infecção não alterou a competência vetorial. Dessa forma, demonstrando a probabilidade desses mosquitos adquirirem múltiplos arbovírus durante uma única atividade alimentar.

Ademais, a presença dos vírus DENV e CHIKV foi relatada em surtos simultâneos de co-infecção em humanos de ambos os vírus em Saint Martin e Gabão, sendo nesse último também observada a co-infecção no mosquito coletados em campo (CARON et al., 2012; OMARJEE, 2014). Recentemente, um estudo laboratorial demonstrou que os mosquitos *Ae. aegypti* infectados sequencialmente com DENV e CHIKV são capazes de disseminar e transmitir ambos os vírus simultaneamente (NUCKOLS et al., 2015). Na Colômbia, foram relatados sete casos fatais de pacientes com dengue e co-infectados com CHIKV. Esses casos foram confirmados por características clínicas, laboratoriais e avaliação da histopatologia dos tecidos da autópsia (MERCADO et al., 2016).

Porém, foi realizado pelo Dr. Fernando Lucas Melo e Dr. Bergmann Morais Ribeiro o sequenciamento genômico das duas amostras de *Ae. aegypti* que foram positivas para os três arbovírus avaliadas nesse estudo, confirmando a presença apenas do ZIKV. Charrel et al. (2017) avaliaram a capacidade dos laboratórios europeus em realizar testes moleculares para diagnóstico de ZIKV. Por meio da avaliação externa de qualidade, demonstrou oscilação na sensibilidade técnica em 60% dos laboratórios participantes. No Brasil, os resultados da avaliação não diferiram significativamente do estudo realizado na Europa, apresentando

sensibilidade e especificidade limitadas (FISCHER et al., 2018). Os autores orientam que a metodologia usada necessita de outras técnicas para confirmar a presença desse arbovírus e ressaltam a importância avaliações contínuas de qualidade desde a extração até testes de diagnóstico.

Nesse estudo, a positividade de ZIKV foi significativamente maior em *Cx. quinquefasciatus*. Além disso, nas amostras restantes foi detectado simultaneamente DENV/ZIKV e apenas uma amostra foi positiva para o três arbovírus. Estudo realizado em Recife-PE, o ZIKV foi detectado no intestino médio, nas glândulas salivares e na saliva de *Cx. quinquefasciatus*, que foram infectados artificialmente de cepa do ZIKV isolada de um paciente local (GUEDES et al., 2017). Durante a epidemia em Vitória-ES, detectaram, isolaram e sequenciaram o genoma do ZIKV em amostras de *Cx. quinquefasciatus* aspirados nessa região. Esses resultados reforçam a hipótese de que essa espécie possivelmente está envolvida na transmissão desse vírus (AYRES et al., 2019).

Em outro estudo, realizado na China, demonstrou-se a presença do ZIKV em *Cx. quinquefasciatus* na saliva e nas glândulas salivares até 8 dias e 10 dias, respectivamente, após a refeição de sangue infectado. Concomitantemente, em outro experimento de transmissão, identificou-se a presença desse arbovírus em camundongos após serem picados por mosquitos infectados (GUO et al., 2016). Phumee et al. (2019) demonstraram que o ZIKV pode ser transmitido verticalmente até a sexta geração em fêmeas e segunda geração em machos de *Cx. quinquefasciatus*. Entretanto, em *Ae. aegypti* o ZIKV foi detectável apenas na primeira geração. Esses resultados apontam que esse arbovírus tem a capacidade de se replicar nos tecidos de *Cx. quinquefasciatus* e possivelmente pode desempenhar papel secundário ou de potencial vetor.

Em contrapartida, estudos realizados no Sudeste e Nordeste do Brasil, comprovaram que *Cx. quinquefasciatus* capturados nessas regiões não possuíam competência vetorial para ZIKV (FERNANDES et al., 2016; FERNANDES et al., 2017). Esse resultado corrobora com estudos realizados na China (LIU et al., 2017), Guadalupe- Ilha Francesa (HERY et al., 2019) e EUA (MAIN et al., 2018). Diante disso, podemos elencar alguns fatores que podem afetar a competência dos vetores. Os mosquitos coletados em diferentes regiões geográficas podem ter graus distintos

de competência viral (PHUMEE et al., 2019). Os fatores ambientais e genéticos afetam a competência do mosquito para arboviroses (TABACHNICK, 2013). Ademais, a microbiota dos mosquitos influencia nos aspectos da biologia do hospedeiro, incluindo competência vetorial para arboviroses como dengue, Zika e chikungunya. Esses fatores são pouco elucidados na literatura, tornando-se um grande desafio para a saúde pública (SALDAÑA, HEGDE & HUGHE, 2017).

Após a realização do repasto sanguíneo virêmico em paciente os mosquitos *Cx. quinquefasciatus* foram naturalmente infectados por DENV-2. Apesar de apresentarem taxas de infecção menores que as de *Ae. aegypti* e *Ae. albopitius*, o autor sugere que esse mosquito possa desempenhar um papel menos importante na transmissão desse arbovírus (LUO, 1993). Recentemente, fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* foram coletadas em Cuiabá-MT, apresentaram frequência de infecção natural e taxa mínima de infecção (MIR) positivas para vírus da dengue (DENV-4) (SERRA et al., 2016).

Não há relatos de detecção simultânea desses arbovírus em *Cx. quinquefasciatus* na literatura. Alguns autores testaram a competência vetorial desse mosquito para o vírus que causam doenças como dengue (VAZEILLE-FALCOZ et al., 1999) e chikungunya (RICHARDS, ANDERSON & SMARTT, 2010; GHOSH et al., 2019), mas concluíram que esse mosquito não é um vetor competente para transmitir essas arboviroses.

De acordo com a pós-doutora Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi, a última placa do kit de RT-qPCR apresentava pouco material liofilizado e cor diferente dos utilizados anteriormente. Essas características podem ter contribuído para o número anormal de positividade para o ZIKV em 31 pools de *Cx. quinquefasciatus* analisados na placa. Porém, não houve amplificação dos controles negativos, apenas a amplificação do controle interno em todas as reações (FAGO MS2). Esses resultados reforçam a necessidade de utilizar diferentes metodologias para confirmar a presença desses arbovírus nas amostras de *Cx. quinquefasciatus*. Diante disso, futuramente os pools de *Cx. quinquefasciatus* serão submetidos ao sequenciamento do genoma para detectar e caracterizar DENV, ZIKV e CHIKV.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que há circulação desses arbovírus nos mosquitos em São Sebastião- DF. Dessa forma, é necessária a

continuidade, intensificação e ampliação da cobertura do sistema de vigilância entomológica e epidemiológica de dengue, Zika e chikungunya nessa região administrativa e outras áreas do DF e do Brasil. Essas ações são primordiais para a ampliação da vigilância das arboviroses e desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle.

Nesse estudo, a análise da proporção de pools positivos para arbovírus em relação ao total de pools testados não apresentou correlação nos períodos com ou sem a disseminação do PPF na AC e AI. O estudo realizado por Abad-Franch, Zamora-Perea e Luz (2017) estimou por meio de modelos matemáticos que a disseminação do PPF reduziu efetivamente as populações de mosquitos em escala espacial, bem como bloqueou a transmissão desses arbovírus por mosquitos. Outro estudo realizado no sul do Vietnã por Tsunoda et al. (2013), na qual avaliou método (Olyset® Net e PPF) de controle vetorial em duas áreas, demonstrou que na área de intervenção houve redução na taxa infecção pelo vírus da dengue, principalmente em crianças com idade de 2 a 5 anos. Assim, indicando que a metodologia preveniu a transmissão dessa arbovirose em crianças pequenas, contanto que permaneçam em casa a maior parte do tempo.

A maioria dos estudos apresentam parâmetros entomológicos, ainda há poucos estudos relacionando o efeito do controle de mosquitos na redução de casos dessas arboviroses em humanos. Assim, a realização de futuros trabalhos nesse contexto é necessária para o acompanhamento da transmissão dessas arboviroses e prevenção de futuras epidemias.

Apesar de já ser preconizado o uso do PPF pelo Ministério da Saúde, nesse estudo foi apresentado uma alternativa que contribui no trabalho realizado em campo, principalmente pelos agentes que trabalham no combate aos vetores. Percebe-se que seu uso é de fácil operacionalidade, baixo risco à saúde de humanos e animais domésticos, requer pouco cuidado de manutenção, além de ser baixo custo financeiro frente a outros compostos químicos. Foi observado nesse estudo uma redução significativa na quantidade mosquitos adultos após seu uso. Diante das endemias arbovirais no Brasil, principalmente no que tange DENV, ZIKV e CHIKV, é necessário que medidas efetivas de controle e combate a vetores seja colocada em prática. Outro fator importante demonstrado nesse estudo, a

colaboração da comunidade no desenvolvimento de um método de controle de mosquitos. Programas de controle de mosquitos tornam-se eficazes e sustentáveis com a participação da comunidade, como referido por Harburguer et al. (2011). Estudos de vigilância envolvendo entomologia e virologia são ferramentas importantes para monitorar mosquitos e determinar estratégias de intervenção para controlar e prevenir epidemias causadas por arboviroses- dengue, Zika e chikungunya.

6 CONCLUSÃO

Houve redução significativa na quantidade de mosquitos na área de intervenção com estações disseminadoras de piriproxifeno (EDs) em São Sebastião-DF. A redução foi de 72,5% na quantidade de mosquitos na área com EDs durante a intervenção, enquanto na área controle houve um aumento de 7,6% no mesmo período. Especificamente, as capturas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* na Al diminuíram em 84,3% e 47,3%, respectivamente durante a instalação das EDs.

A quantidade de mosquitos foi maior nos meses com maior precipitação. Porém, ao analisar somente os dados dos meses chuvosos (para reduzir influência de fatores climáticos na análise) observou-se uma redução de 70% e 42% na quantidade de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* respectivamente, indicando que o efeito da intervenção com EDs foi relevante para explicar a redução na quantidade desses mosquitos.

Os vírus DENV, ZIKV e CHIKV foram detectados em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* no Distrito Federal sendo que o diagnóstico molecular por RT-qPCR indicou co-circulação desses vírus nos mosquitos. Porém, é necessário a realização do sequenciamento gênomico para confirmar o resultado da RT-qPCR.

Foram observadas diferenças na proporção de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* positivos para DENV e ZIKV; uma maior proporção de *Cx. quinquefasciatus* positivos para ZIKV foi detectada.

Não houve diferença na proporção de mosquitos positivos para DENV, ZIKV e CHIKV nos períodos com ou sem intervenção nas áreas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Mosquito-Disseminated Pyriproxyfen Yields High Breeding-Site Coverage and Boosts Juvenile Mosquito Mortality at the Neighborhood Scale. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 7, n. 9, p. 1-17, Abril 2015.

ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA, E.; LUZ, S. L. B. Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. **PLOS Medicine**, Estados Unidos, v. 14, n. 1, p. 1-22, 17 Janeiro 2017.

ABRAHAM, R. et al. Correlation of phylogenetic clade diversification and in vitro infectivity differences among Cosmopolitan genotype strains of Chikungunya virus. **Infection, Genetics and Evolution**, Estados Unidos, v. 37, p. 174–184, Novembro 2016.

ALEXANDER, N. et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. **Tropical Medicine and International Health**, Inglaterra, v. 16, n. 8, p. 936–948, Agosto 2011.

ALMEIDA, APG. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal- Desafios para o Século XXI. **Acta médica portuguesa**, Portugal, v. 24, n. 6, p. 961-974, Fevereiro 2011.

ALVAREZ, LC et al. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos in Venezuela. **Pest Management Science**, Inglaterra, v. 70, n. 8, p. 1262-6, Agosto 2014.

ALWIS, R. et al. In-Depth Analysis of the Antibody Response of Individuals Exposed to Primary Dengue Virus Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 5, n. 6, p. 2-8, Junho 2011.

AMARAL, RJV; DANSA-PETRETSKI, M. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**: Interação Patógeno-Vetor: Dengue. Capítulo 14. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

Disponível em:

http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_14_Interacao_Patogeno_Vetor_-_Dengue.pdf. Acesso em: 18 Dez. 2018.

AMORETTY, PR. et al. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. **Acta Scientiae & Technicae**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 88-98, Fevereiro 2013.

AMRAOUI, F. et al. Culex mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. **Eurosurveillance**, Suécia, v. 21, n. 35, Setembro 2016.

AN, W. et al. Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, China, v. 32, n. 6, p. 441–453, Dezembro 2017.

ARAÚJO, TO et al. Criadouros de *Aedes aegypti* e perfil sócio-econômico das residências em área controle e de intervenção com estações disseminadoras de pyriproxyfen em São Sebastião, Distrito Federal, Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 54. 2018, Recife-PE, 2018.

ARENSBURGER, P. et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. **Science**, Estados Unidos, v. 330, n. 6000, p. 86–88, Outubro 2010.

AYRES, CFJ. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet**, Estados Unidos, v. 16, n. 3, p. 278-279, Março 2016.

AYRES, CFJ et al. Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Parasites & Vectors**, Inglaterra, v. 12, n. 1, p. 220, Maio 2019.

AZEREDO, EL et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. **PLOS Currents**, Estados Unidos, v. 15, n. 10, Fev 2018.

AZEVEDO, RSS; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 49, p. 2-6, Setembro 2015.

BARBOSA, IR. et al. Identificação de áreas prioritárias para a vigilância e controle de dengue e outras arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti* no município de Natal-RN: relato de experiência. **Epidemiologia Serviço de Saúde**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 629-638, Jul-Set 2017.

BARBOSA, PP. et al. Vector Surveillance for Dengue Virus Detection in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Inglaterra, v. 53, n. 3, p. 613-619, Maio 2016.

BARONTI, C. et al. Complete Coding Sequence of Zika Virus from a French Polynesia Outbreak in 2013. **Genome Announcements**, Estados Unidos, v. 2, n. 3, p. 1-2, Junho 2014.

- BARRETO, ML.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, Dezembro 2008.
- BASILE, K.; KOK, J.; DWYER, DE. Zika virus: what, where from and where to?. **Pathology**, Inglaterra, v. 49, n. 7, p. 698-706, Dezembro 2017.
- BESERRA, EB. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 99, n. 3, p. 281-285, Setembro 2009.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, Inglaterra, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 Abril 2013.
- BILAL, H.; AKRAM, W.; ALI-HASSAN, S. Larvicidal Activity of Citrus Limonoids against *Aedes albopictus* Larvae. **Journal of arthropod-borne diseases**, Irã, v. 6, n. 2, p. 104–111, Dezembro 2012.
- BLACK IV, WC. et al. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**, Estados Unidos, v. 33, n. 4, p. 379–388, Jul-Ago 2002.
- BORGES, VAR. Avaliação da infestação do mosquito *Culex quinquefasciatus* no entorno do rio Palmeiras, no município de Pratápolis (MG). **Ciência et Praxis**, Minas Gerais, v. 7, n. 14, p. 31-34, 2014.
- BOSIO, CF; BEATY, BJ; BLACK IV, WC. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. **Send to: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Estados Unidos, v. 59, n. 6, p. 965–970, Dezembro 1998.
- BRADY, OJ. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 6, n. 8, p. 1760, 07 Agosto 2012.
- BRAGA, IA. et al. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, Março 2004.
- BRAGA, IA.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência*. **Epidemiologia Serviço da Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, Out-Dez 2007.
- BRASIL, FUNASA- Fundação Nacional de Saúde. Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor: Manual de Normas Técnicas. **Ministério da Saúde**. Brasília,

2001a. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf. Acesso em: 13 Dez. 2018.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 47 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 31, 2014a.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, Brasil, v. 49, n. 53, p. 1-14, Novembro 2018a.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, Brasil, v. 49, n. 59, p. 1-14, Dezembro 2018d.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 38, 2016a.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 45, 2017a.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, Brasil, v. 48, n. 3, p. 1-11, 2017b.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 44 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, Brasil, v. 49, n. 51, p. 1-14, Novembro 2018b.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde– Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 42 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 44, Nov. 2018c.

BRASIL, Subsecretaria de Vigilância à Saúde/Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Comportamento epidemiológico das arboviroses, Distrito Federal, até a

semana epidemiológica nº22, 2019. **Informativo Epidemiológico**, Brasília-DF, v. 14, n. 20, Maio 2019.

BRASIL. Chikungunya: Manejo Clínico. **Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasil, 2017c, p. 1-68. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico.pdf. Acesso em: 16 Dez. 2018.

BRASIL. Controle de vetores e procedimentos de segurança. **Ministério da Saúde-Fundação Nacional da Saúde**. Brasília-DF, 2001b. 204 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/controle_vetores.pdf. Acesso em: 6 Jan. 2019.

BRASIL. DENGUE diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. **Ministério da Saúde**. Brasília – DF, 2016b, p. 1-82. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_manejo_adulto_crianca__4ed_2011.pdf. Acesso em: 22 Jul. 2019.

BRASIL. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Brasília-DF, 2009. 200 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf. Acesso em: 6 Jan. 2019.

BRASIL. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*: Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília-DF, 2011. 13 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_culex_quinquefasciatus.pdf. Acesso em: 2 Jan. 2019.

BRASIL. Orientações técnica para utilização do larvicida pyriproxifen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*. **Ministério da Saúde**. Brasil, 2014b. 3 p. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>. Acesso em: 29 Jan. 2019.

BRASIL. Presidência da República. Lei n. 13.301 de 27 de Junho de 2016. . Brasília, 27 de Junho de 2016. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13301.htm. Acesso em: 11 Jan. 2019.

BRASIL. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). **Ministério da Saúde-Fundação Nacional da Saúde**. Brasília, 2002. 32 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf. Acesso em: 10 Jan. 2019.

BRASIL. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do Sistema Nervoso Central (SNC) Versão 2: Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional - ESPII. **Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2016c, p. 2-60. Disponível em: <http://www.combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Microcefalia-Protocolo-de-vigilancia-e-resposta-10mar2016-18h.pdf>. Acesso em: 16 Dez. 2018.

BRASIL. Regimento Interno do Ministério da Saúde: Decreto n.º 8.901, de 10 de novembro de 2016. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2017d. 32 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/regimento_interno_ministerio_saude.pdf. Acesso em: 4 Fev. 2019.

BRITO, CAA. Review article alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 50, n. 5, p. 585-589, Set-Out. 2017.

BROWN, JE. et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, Estados Unidos, v. 68, n. 2, p. 514–525, Outubro 2014.

BURATTINI, MN. et al. Age and regional differences in clinical presentation and risk of hospitalization for dengue in Brazil, 2000-2014. **Clinics**, São Paulo, v. 71, n. 8, p. 455–463, Agosto 2016.

CAMPOS, GS.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 21, n. 10, Outubro 2015.

CAO-LORMEAU, V. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, Junho 2014.

CAPUTO, B. et al. The “Auto-Dissemination” Approach: A Novel Concept to Fight *Aedes albopictus* in Urban Areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 6, n. 8, p. e1793, Agosto 2012.

CARDO, MV et al. Heterogeneous distribution of *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* and their hybrids along the urbanisation gradient. **Acta tropica**, Países Baixos, v. 178, p. 229-235, Dezembro 2017.

CARDONA-OSPINA, J.A; DIAZ-QUIJANO, FA; RODRÍGUEZ-MORALES, AJ. Burden of chikungunya in Latin American countries: estimates of disability-adjusted life-years (DALY) lost in the 2014 epidemic. **International Journal of Infectious Diseases**, Canadá, v. 38, p. 60-61, Setembro 2015.

CARDOSO, AF. et al. *Culex quinquefasciatus* vitellogenesis: morphological and biochemical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 254-262, Maio 2010.

CARDOSO, CW et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 21, n. 12, p. 2274–2276, Dezembro 2015.

CARON, M et al. Recent Introduction and Rapid Dissemination of Chikungunya Virus and Dengue Virus Serotype 2 Associated With Human and Mosquito Coinfections in Gabon, Central Africa. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 55, n. 6, p. 45–e5315, Setembro 2012.

CARVALHO, BL. **Análise do perfil de suscetibilidade de seis populações de *Aedes aegypti* do Distrito Federal ao análogo de hormônio juvenil pyriproxyfen**. Brasília- DF, 2018. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Medicina Tropical) - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2018.

CARVALHO, FD; MOREIRA, LA. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? **Neotropical Entomology- Springer**, Países Baixos, v. 46 , n. 3, p. 243-255, Março 2017.

CARVALHO, MS. L. et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 623-9, Maio 2004.

CASALI, CG. et al. A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002: The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 296-299, Jul-Ago 2004.

CASSEB, AR. et al. Arbovírus: importante zoonose na amazônia brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 9-21, Setembro 2013.

CDC. Dengue: Epidemiology. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>. Acesso em: 31 Out. 2018.

CDC. Memorando- Testes de diagnóstico revistos para os vírus que causam Zika, chikungunya e dengue em laboratórios de saúde pública dos EUA. **Centers for Disease Control and Prevention**. Estados Unidos, 2016. Disponível em: file:///C:/Users/DELL/Downloads/cdc_39720_DS1.pdf. Acesso em: 15 Dez. 2018.

CDC. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **Centers for Diseases Control and Prevotion**. Estados Unidos, 2016. 59–62 p. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e2.htm#suggestedcitation>.

Acesso em: 29 Nov. 2018.

CHANDEL, K. et al. Targeting a Hidden Enemy: Pyriproxyfen Autodissemination Strategy for the Control of the Container Mosquito *Aedes albopictus* in Cryptic Habitats. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 10, n. 12, p. e0005235, Dezembro 2016.

CHARREL, R et al. Variable Sensitivity in Molecular Detection of Zika Virus in European Expert Laboratories: External Quality Assessment, November 2016. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v. 55, n. 11, p. 3219–3226, Nov 2017.

COFFEY, LL. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, Inglaterra, v. 8, n. 2, p. 155–176, 2013.

CONSOLI, RAGB; OLIVEIRA, RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Editores FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 1994-228, 1994.

COON, KIL. et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development: (2014) 23, 2727–2739. **Molecular Ecology**, Inglaterra, v. 23, n. 11, p. 2727–2739, Junho 2014.

COSTA, CF. et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 12, n. 7, p. 1-12, Julho 2018.

COSTA, I. MP; CALADO, D. C. Incidence of dengue cases (2007-2013) and seasonal distribution of mosquitoes (Diptera: Culicidae) (2012-2013) in Barreiras, Bahia, Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 735-744, out-dez 2016.

COURET, J.; DOTSON, E.; BENEDICT, MQ. Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Plos One**, Estados Unidos, v. 9, n. 2, p. 1-9, Fevereiro 2014.

CUNHA, RV; TRINTA, KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 112, n. 8, p. 523-531, Agosto 2017.

DAVID, MR; RIBEIRO, GS; DE FREITAS, RM. Bionomics of *Culex quinquefasciatus* within urban areas of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 858-65, Outubro 2012.

DAVID, MR; RIBEIRO, GS; FREITAS, RM. Bionomics of *Culex quinquefasciatus* within urban areas of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 858-65, Outubro 2012.

DE OLIVEIRA, LB et al. Perfil do uso populacional de inseticidas domésticos no combate a mosquitos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 79-92, jan/jun 2015.

DEVINE, GJ. et al. Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v. 106, n. 28, p. 11530-11344, Julho 2009.

DIAS, LS et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **Plos One**, Estados Unidos, v. 12, n. 3, p. 1-15, Março 2017.

DICK, GWA.; KITCHEN, SF.; HADDOW, AJ. Zika virus (i). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Inglaterra, v. 46, n. 5, p. 509-520, Setembro 1952.

DINIZ, MMCSL et al. Resistência de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 775-782, Maio 2014.

DONALISIO, MR; FREITAS, ARR. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Campinas, v. 18, n. 1, Jan-Mar 2015.

DONALÍSIO, MR; GLASSER, CM. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

DONG, K. et al. Molecular Biology of Insect Sodium Channels and Pyrethroid Resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Inglaterra, v. 50, p. 1-17, Julho 2014.

DOUCOURE, S. et al. Human Antibody Response to *Aedes albopictus* Salivary Proteins: A Potential Biomarker to Evaluate the Efficacy of Vector Control in an Area of Chikungunya and Dengue Virus Transmission. **BioMed Research International**, Estados Unidos, v. 2014, n. 746509, p. 1-8, Abril 2014.

DRIGGERS, RW. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **The New England Journal of Medicine**, Estados Unidos, v. 374, n. 22, p. 2142-215, Junho 2016.

ERASMUS, JH.; ROSSI, SL.; WEAVER, S. C. Development of Vaccines for Chikungunya Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 214, n. supl 5, p. S488-S496, Dezembro 2016.

ESU, E et al. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. **Tropical Medicine & International Health**, Inglaterra, v. 15, n. 5, p. 619-31, Maio 2010.

FARAJOLLAHI, A. et al. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, Países Baixos, v. 11, n. 7, p. 1577–1585, Outubro 2011.

FARES, RCG. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, Estados Unidos, v. 2015, 9 Agosto 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/321873/>. Acesso em: 13 Nov. 2018.

FARNESI, LC et al. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 10, n. 11, p. 1-20, Outubro 2017.

FARNESI, LC et al. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect Physiology**, Inglaterra, v. 83, p. 43–52, Dezembro 2015.

FARNESI, LC. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect Physiology**, Inglaterra, v. 83, p. 43-52, Dezembro 2015.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 8, n. 1, p. 1-10, Janeiro 2014.

FERNANDES, RS. **Competência vetorial de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil**. Rio de Janeiro, 2017, p. 1-93. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, 2017.

FERNANDES, RS et al. *Culex quinquefasciatus* from areas with the highest incidence of microcephaly associated with Zika virus infections in the Northeast Region of Brazil are refractory to the virus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 8, p. 577-579, Agosto 2017.

FERNANDES, RS et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 10, n. 9, p. e0004993, Set 2016.

FERREIRA-DE-LIMA, VH.; LIMA-CAMARA, TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, Inglaterra, v. 11, n. 77, p. 1-8, Fevereiro 2018.

FIGUEIREDO, LTM. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Ribeirão Preto-SP, Brasil, v. 48, n. 3, p. 233–234, Mai-Jun 2015.

FISCHER, C et al. External Quality Assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 24, n. 5, Maio 2018.

FORATTINI, OP; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 676-7, 2003.

FRANZ, A. WE et al. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, Estados Unidos, v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 8 Julho 2015.

FREEMAN, MC. et al. Emerging arboviruses and implications for pediatric transplantation: A review. **Pediatric Transplantation**, Denmark, p. 1-12, 19 Outubro 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/petr.13303>. Acesso em: 22 Out. 2018.

FÉ, NF. et al. Culicidae insect fauna from rural zone in amazonas State with incidence of sylvatic yellow fever. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 3, n. 36, p. 343-348, Mai-Jun 2003.

GARG, H; MEHMETOGLU-GURBUZ, T; JOSHI, A. Recent Advances in Zika Virus Vaccines. **Vírus**, Suíça, v. 10, n. 11, p. 1-13, Novembro 2018.

GENTILE, C et al. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: cry2 is different. **Journal of Biological Rhythms**, Estados Unidos, v. 24, n. 6, p. 444-51, Dezembro 2009.

- GHOSH, A et al. Understanding the mechanism of Chikungunya virus vector competence in three species of mosquitoes. **Medical and Veterinary Entomology**, Inglaterra, p. 1-13, Mar 2019.
- GIOVANETTI, M. et al. Genetic evidence of Zika virus in mother's breast milk and body fluids of a newborn with severe congenital defects. **Clinical Microbiology and Infection**, Inglaterra, v. 24, n. 10, p. 1111-1112, Outubro 2018.
- GLASER, RL; MEOLA, MA. The Native Wolbachia Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. **Plos One**, Estados Unidos, v. 5, n. 8, p. 11977, Agosto 2010.
- GOURINAT, A. et al. Detection of Zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 21, n. 1, p. 84-86, Janeiro 2015.
- GRANDADAM, Marc et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 17, n. 5, p. 910-913, Maio 2011.
- GUBLER, DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 11, n. 3, p. 480–496, Jul 1998.
- GUBLER, DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, Inglaterra, v. 10, n. 2, p. 100-103, Fevereiro 2002.
- GUBLER, DJ; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 1, n. 2, p. 55–57, Abr-Jun 1995.
- GUEDES, DRD. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, Estados Unidos, v. 6, n. 8, p. 1-11, Agosto 2017.
- GUO, X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, Estados Unidos, v. 5, n. 9, p. 1-5, Setembro 2016.
- HAHN, MB. et al. Updated Reported Distribution of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United States, 1995–2016. **Journal of Medical Entomology**, Inglaterra, v. 54, n. 5, p. 1420–1424, 2017.
- HALSTEAD, SB. Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 21, n. 4, p. 557-561, Abril 2015.

HALSTEAD, SB.; RUSSELL, P. K. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. **Vaccine**, Países Baixos, v. 34, n. 14, p. 1643-7, 29 Março 2016.

HAMID, PH et al. *Aedes aegypti* resistance development to commonly used insecticides in Jakarta, Indonesia. **PLoS One**, Estados Unidos, v. 12, n. 12, p. e0189680, Dez 2017.

HARBACH, RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591–638, 2007.

HARBACH, RE. *Culex pipiens*: Species Versus Species Complex – Taxonomic History and Perspective. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Estados Unidos, v. 28, n. 4s, p. 10-23, Dezembro 2012.

HARBACH, RE. Culicidae. **Mosquito Taxonomic Inventory**. 2019. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>. Acesso em: 28 Abr. 2019.

HARBURGUER, L et al. A New Strategy for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control With Community Participation Using a New Fumigant Formulation. **Journal of Medical Entomology**, Inglaterra, v. 48, n. 3, p. 577-83, Maio 2011.

HEINEN, LBS et al. Saint Louis encephalitis virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 1-6, Maio/jun 2015.

HERY, L et al. Transmission potential of African, Asian and American Zika virus strains by *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from Guadeloupe (French West Indies). **Emerging Microbes & Infections**, Estados Unidos, v. 8, n. 1, p. 699-706, 2019.

IGBINOSA, II. et al. Zika Virus: Common Questions and Answers. **American Family Physician**, Georgia, v. 95, n. 8, p. 507-513, Abril 2017.

JIGGINS, FM. The spread of Wolbachia through mosquito populations. **Plos Biology**, Estados Unidos, v. 15, n. 6, p. 1-6, Junho 2017.

JOSEPH, CC et al. Larvicidal and mosquitocidal extracts, a coumarin, isoflavonoids and pterocarpan from *Neorautanenia mitis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Inglaterra, v. 98, n. 8, p. 451–455, Agosto 2004.

KARUNARATNE, SHPP et al. Insecticide resistance and, efficacy of space spraying and larviciding in the control of dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*

in Sri Lanka. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Estados Unidos, v. 107, n. 1, p. 98-105, Setembro 2013.

KARUNARATNE, SHPP et al. Insecticide resistance and, efficacy of space spraying and larviciding in the control of dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Sri Lanka. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Estados Unidos, v. 107, n. 1, p. 98–105, Setembro 2013.

KHAN, AH. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, Grã-Bretanha, v. 83, p. 3075–3084, 2002.

KING, AMQ. et al. **Classification and Nomenclature of Viruses**: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 9. ed. Elsevier, 2011. 1003 – 1020 p.

KRAEMER, MUG et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, Inglaterra, Junho 2015. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/08347>. Acesso em: 13 Dez. 2018.

KULARATNE, SAM. Dengue fever. **British Medical Journal**, Inglaterra, p. 1-10, 15 Setembro 2015. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/351/bmj.h4661.long>. Acesso em: 6 Nov. 2018.

KUMAR, S. et al. Larvicidal, repellent, and irritant potential of the seed-derived essential oil of *Apium graveolens* against dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Frontiers in Public Health**, Suíça, v. 2, n. 147, p. 1-6, Setembro 2014.

KUTSUNA, S. et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. **Euro Surveillance**, Suécia, v. 19, n. 4, p. 1-4, Janeiro 2014.

LAPORTA, GZ; URBINATTI, P. R; NATAL, D. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 125-127, Março 2006.

LEYVA, YR et al. Eficacia del pyriproxifeno para el control de *Aedes (S) aegypti* (Diptera: Culicidae) en cepas con diferentes niveles de resistencia a temefos. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Ciudad de la Habana, v. 62, n. 3, Set-Dez 2010.

LI, M. I. et al. Oral Susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 6, n. 8, p. 1-6, Agosto 2012.

LIANG, G; GAO, X; GOULD, EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, China, v. 4, n. 18, p. 1-5, 25 Março 2015.

LIMA-CAMARA, TN; HONÓRIO, N. A; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2079-2084, Outubro 2006.

LIU, Z et al. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 23, n. 7, p. 1085-1091, Jul 2017.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, REC. General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil: Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Londrina- PR, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LUO, Q. A study on transmission of dengue virus by *Culex fatigans*. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi**, China, v. 14, n. 2, p. 67-9, Abril 1993.

MACNAMARA, FN. Zika Virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of Jaundice in Nigeria. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygienil**, Inglaterra, v. 48, n. 2, Março 1954.

MAIA, FG et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **International Journal Of Infectious Diseases**, Canadá, v. 96, n. 7, Set 2014.

MAIN, BJ et al. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex tarsalis*, and *Culex quinquefasciatus* from California for Zika virus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 12, n. 6, p. e0006524, Jun 2018.

MAINS, JW; BRELSFOARD, C. L; DOBSON, S. L. Male Mosquitoes as Vehicles for Insecticide. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 9, n. 1, p. 1-17, 15 Janeiro 2015.

MAOZ, D. et al. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 11, n. 7, p. 1-8, Julho 2017.

MARINI, G et al. Effectiveness of Ultra-Low Volume insecticide spraying to prevent dengue in a non-endemic metropolitan area of Brazil. **PLoS Computational Biology**, Estados Unidos, v. 15, n. 3, p. e1006831, Mar 2019.

MARQUES, GRAM. et al. Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 579-87, Junho 2013.

MASCARENHAS, M. et al. A scoping review of published literature on chikungunya virus. **Plos One**, Estados Unidos, v. 13, n. 11, p. 1-40, Novembro (2018).

MERCADO, M et al. Clinical and histopathological features of fatal cases with dengue and chikungunya virus co-infection in Colombia, 2014 to 2015. **Euro Surveillance**, Suécia, v. 21, n. 22, Outubro 2016.

MORAIS, SA. et al. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 5, p. 672-676, Agosto 2010.

MOTA, MTO. et al. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge: 47(Suppl 1): 38–50. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 47, n. 1, p. 38–50, Dezembro 2016.

MOYES, CL et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 11, n. 7, p. e0005625, Julho 2017.

MULLER, DA; DEPELSENAIRE, ACI; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 215, n. 2, p. S89–S95, Março 2017.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, Países Baixos, v. 68, p. 53-55, Julho 2015.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveillance**, Suécia, v. 19, n. 14, p. 1-3, Fevereiro 2014.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V.; GUBLER, DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, Inglaterra, v. 386, n. 9990, p. 243-244, Julho 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 29, n. 3, p. 487-524, Julho 2016.

MUSSO, D; NILLES, EJ.; CAO-LORMEAU, VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, Estados Unidos, v. 20, n. 10, Outubro 2014. O595-O596.

NASCI, RS et al. A lightweight battery-powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. **Mosquito News**, v. 41, p. 808-811, 1981.

NOGUEIRA, RMR. et al. Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002. **Emerging infectious diseases**, Estados Unidos, v. 11, n. 9, p. 1376-1381, Setembro 2005.

NORMILE, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts: Science. 2013 Oct 25;342(6157):415. **Science**, Estados Unidos, v. 342, n. 6157, p. 415, Out. 2013.

NORONHA, L. et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 5, p. 287-93, Maio 2016.

NUCKOLS, JT et al. Evaluation of Simultaneous Transmission of Chikungunya Virus and Dengue Virus Type 2 in Infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Inglaterra, v. 52, n. 3, p. 447-51, Maio 2015.

OLIVEIRA, MCS. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudoeste, 2007, p. 1-38.

OMARJEE, R. Importance of case definition to monitor ongoing outbreak of chikungunya virus on a background of actively circulating dengue virus, St Martin, December 2013 to January 2014. **Euro Surveillance**, Suécia, n. 19, p. 13, Abril 2014.

OSORIO, JE; WALLACE, D; STINCHCOMB, DT. A recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate based on a dengue virus serotype 2 backbone. **Expert Review of Vaccines**, Inglaterra, v. 15, n. 4, p. 497-508, 22 Fevereiro 2016.

PABBARAJU, K. et al. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v. 83, p. 66–71, Outubro 2016.

PAHO, Pan American Health Organization. Dengue mortality rate for countries and territories of the Americas, 1990–2018. **Pan American Health Organization**. 2018b. Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores->

dengue-en/dengue-nacional-en/253-dengue-mortalidad-tasa-en.html?showall=&start=2. Acesso em: 31 Out. 2018.

PAHO. Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion) 1980–2018. **Pan American Health Organization**. 2018a. Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>. Acesso em: 1 Nov. 2018.

PANCETTI, F. G. M. **Análise da atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) do Parque Municipal do Piqueri São Paulo, SP**. São Paulo, 2017. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo-Faculdade de Saúde Pública, 2017.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, Philadelphia- Pennsylvania, v. XVII, n. 6, p. 661-679, Novembro 2016.

PHUMEE, A et al. Vertical transmission of Zika virus in *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. **Scientific Reports**, Inglaterra, v. 9, n. 1, p. 5257, Mar 2019.

PINHEIRO, TJ. et al. Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections: Manifestações neurológicas das infecções pelos vírus Zika e Chikungunya. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, Brasil, v. 74, n. 11, p. 937-943, Novembro 2016.

POWERS, AM. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. **Clinical microbiology reviews**, Estados Unidos, v. 31, n. 1, p. 1-29, Janeiro 2018.

PYKE, AT. et al. Imported Zika Virus Infection from the Cook Islands into Australia, 2014. **Plos Currents**, Estados Unidos, Junho 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055592/>. Acesso em: 26 Nov. 2018.

RAMALHO, ILC. et al. Dengue 4 in Ceará, Brazil: characterisation of epidemiological and laboratorial aspects and causes of death during the first epidemic in the state. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 113, n. 11, 18 Outubro 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6193373/>. Acesso em: 30 Out. 2018.

REBELO, FM et al. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007 - análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3493-3502, 2011.

REID, S.; RIMMER, K.; THAKUR, K. Zika Virus and Neurologic Disease. **Neurologic Clinics**, Estados Unidos, v. 36, n. 4, p. 767-787, Novembro 2018.

RESENDE, MC.; GAMA, RA. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 39, n. 1, p. 72-75, Jan-Fev 2006.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **The Lancet**, Inglaterra, v. 370, n. 9602, p. 1840–46, Dezembro 2007.

RICHARDS, SL; ANDERSON, SL; SMARTT, CT. Vector competence of Florida mosquitoes for chikungunya virus. **Journal of Vector Ecology**, Estados Unidos, v. 35, n. 2, p. 439-443, Dez 2010.

ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Euro Surveillance**, Suécia, v. 19, n. 41, p. 1-8, Outubro 2014.

ROZENDAAL, JA. Vector control: Methods for use by individuals and communities. **WHO-World Health Organization**. Geneva, 1997. 424 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/41968>. Acesso em: 8 Jan. 2019.

RÜCKERT, C et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communication**, Inglaterra, v. 19, n. 8, p. 15412, Maio 2017.

SALAZAR, MI. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology**, Inglaterra, v. 7, n. 9, Janeiro 2007.

SALDAÑA, MA; HEGDE, S; HUGHE, GL. Microbial control of arthropod-borne disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 2, p. 81-93, Fevereiro 2017.

SALLES, TS. et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasites & vectors**, Inglaterra, v. 11, n. 1, p. 264, 24 Abril 2018.

SAMPATHKUMAR, P; SANCHEZ, JL. Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. **Proceedings da Mayo Clinic**, Inglaterra, v. 91, n. 4, p. 514-521, Abril 2016.

SANTANA-MARTÍNEZ, JC; MOLINA, J.; DUSSÁN, J. Asymmetrical Competition between *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Coexisting in Breeding Sites. **Insects**, Suíça, v. 8, n. 111, p. 1-12, Outubro 2017.

SANTOS, VMR et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, Brasil, v. 30, n. 1, p. 159-170, Novembro 2007.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **Plos Medicine**, Estados Unidos, v. 3, n. 7, p. 1058-1070, Julho 2006.

SEGETH. Mapas- São Sebastião- DF: Plantas urbanas. **Secretária de Estado de Gestão do Território e Habitação**. Brasil, 2018. Disponível em: <http://www.segeth.df.gov.br/mapas-2/>. Acesso em: 12 Nov. 2018.

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

SHAIKEVICH, EV et al. Genetic diversity of *Culex pipiens* mosquitoes in distinct populations from Europe: contribution of *Cx. quinquefasciatus* in Mediterranean populations. **Parasites & Vectors**, Inglaterra, v. 9, n. 47, p. 1-16, Janeiro 2016.

SHRIVASTAVA, Susmita et al. Whole genome sequencing, variant analysis, phylogenetics, and deep sequencing of Zika virus strains. **Scientific reports**, Inglaterra, v. 8, n. 1, p. 1-11, Outubro 2018.

SIHUINCHA, M. et al. Potential Use of Pyriproxyfen for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, Inglaterra, v. 42, n. 4, p. 620-630, Julho 2005.

SILVA, JS; MARIANO, Z F; SCOPEL, I. A dengue no brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia**, Brasil, v. 3, n. 6, p. 163-175, Junho 2008.

SOARES, FA et al. Study of oviposition behavior of *Aedes aegypti* in two neighborhoods under the influence of semi-arid climate in the municipality of salinas, state of Minas Gerais, Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 77-88, Jan-Marc 2015.

SUKHRALIA, SS. et al. From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Alemanha, v. 38, n. 1, p. 3-14, Setembro 2018.

SUMAN, DS. et al. Seasonal field efficacy of pyriproxyfen autodissemination stations against container-inhabiting mosquito *Aedes albopictus* under different habitat conditions. **Pest Management Science**, Inglaterra, v. 74, n. 4, p. 885-895, Abril 2018.

SUMITOMO CHEMICAL. Sumilarv- Informação Técnica. **Sumitomo Chemical**. Tóquio, Japão, 2012. 8 p. Disponível em: <https://sumivector.com/sites/default/files/site-content/pdf/Sumilarv-informacao-2012.pdf>. Acesso em: 29 Jan. 2019.

SÃO SEBASTIÃO- DF: CONHEÇA A RA. **Administração Regional de São Sebastião**. São Sebastião- DF, 2017. Disponível em: <http://www.saosebastiao.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>. Acesso em: 24 Out. 2018.

SÃO SEBASTIÃO- DF: MAPAS. **Administração Regional de São Sebastião**. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.saosebastiao.df.gov.br/category/sobre-a-ra/mapas/>. Acesso em: 24 Out. 2018.

TABACHNICK, WJ. Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in Mosquito Arbovirus Transmission Competence. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, Suíça, v. 10, n. 1, p. 249–277, Janeiro 2013.

TAUIL, PL. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 773-774, Out- Dez 2014.

TEIXEIRA, MG.; BARRETO, ML. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciências saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, 1996.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, Áustria, v. 161, n. 3, p. 665–668, Março 2016.

TSUNODA, T et al. Field trial on a novel control method for the dengue vector, *Aedes aegypti* by the systematic use of OlysetW Net and pyriproxyfen in Southern Vietnam. **Parasites & Vectors**, Inglaterra, v. 6, n. 6, p. 1-11, Janeiro 2013.

TUNAZ, H.; UYGUN, N. Insect Growth Regulators for Insect Pest Control*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Turquia, v. 28, p. 377-387, 2004.

UNIVERSIDADE DA FLÓRIDA. *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). **UF/IFAS Entomology and Nematology Department**. Disponível em:

http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm. Acesso em: 2 Jan. 2019.

UNIVERSIDADE DA FLÓRIDA. *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). **UF/IFAS-Entomology and Nematology Department**. Flórida, 2008. Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm. Acesso em: 2 Jan. 2019.

UNIVERSIDADE DA FLÓRIDA. *Culex quinquefasciatus* Say (Insecta: Diptera: Culicidae). **UF/IFAS-Entomology and Nematology Department**. Flórida, 2009. Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm. Acesso em: 5 Jan. 2019.

UNLU, I. et al. Effectiveness of autodissemination stations containing pyriproxyfen in reducing immature *Aedes albopictus* populations. **Parasites & Vectors**, Inglaterra, v. 9, n. 10, p. 139, Março 2017.

VAIS, H. et al. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. **Pesticide biochemistry and physiology**, Estados Unidos, v. 57, n. 10, p. 877-888, Setembro 2001.

VALENÇA, MA et al. Dynamics and characterization of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) key breeding sites. **Neotropical Entomology**, Países Baixos, v. 42, n. 3, p. 3, Jun 2013.

VAZEILLE-FALCOZ, M et al. Replication of dengue type 2 virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, Estados Unidos, v. 60, n. 2, p. 319-21, Fevereiro 1999.

VEGA-RUA, A. et al. High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya and Dengue Viruses in the Southeast of France. **Plos One**, Estados Unidos, v. 8, n. 3, p. 1-8, Março 2013.

VEGA-RÚA, 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. **Journal of Virology**, Estados Unidos, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, Junho 2014.

VOLK, SM. et al. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. **Journal of Virology**, Estados Unidos, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, Julho 2010.

WAGGONER, JJ. et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 22, n. 7, p. 1295-1297, Julho 2016.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/ epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of Virology**, Estados Unidos, v. 74, n. 7, p. 3227-34, Abril 2000.

WEAVER, SC; VASILAKIS, N. Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. **Infection, Genetics and Evolution**, Países Baixos, v. 9, n. 4, p. 523–540, Julho 2009.

WEAVER, SC; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **The New England Journal of Medicine**, Estados Unidos, v. 372, n. 13, p. 1231-1239, Março 2015.

WHITE, MK. et al. Zika Virus: An Emergent Neuropathological Agent. **Annals of Neurology**, Estados Unidos, v. 80, n. 4, p. 479-489, Outubro 2016.

WHITEHEAD, SS. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine? **Expert Review of Vaccines**, Inglaterra, v. 15, n. 4, p. 509-517, 02 Dezembro 2015.

WHO, World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper. **Weekly epidemiological record**, Geneva, v. 36, n. 93, p. 457–476, Setembro 2018b.

WHO. Arthropode-borne and rodent-borne viral diseases. **World Health Organization (WHO)**. Geneva, 1985. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/39922>. Acesso em: 12 Set. 2018.

WHO. Dengue and severe dengue. **World Health Organization**. Geneva, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 31 Out. 2018.

WHO. Dengue- Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. **World Health Organization (WHO)**. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/dengue-diagnosis-treatment/en/>. Acesso em: 22 Jul. 2019.

WHO. Doença do vírus Zika. **World Health Organization**. Geneva, 2016b. Disponível em: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/Zika/pt/>. Acesso em: 29 Nov. 2018.

WHO. Pesticides pesticides and their applica and their application: For the control of vectors and pests of public health importance. **World Health Organization-Department of Control of Neglected Tropical Diseases**. Geneva, 2006. 11 p.

Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69223/WHO_CDS_NTD_WHOPE_S_GCDPP_2006.1_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 5 Jan. 2019.

WHO. Report of the 4th WHOPE_S Working Group Meeting. **World Health Organization**. Geneva, 2001. 102 p. Disponível em:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66683/WHO_CDS_WHOPE_S_2001.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 26 Jan. 2019.

WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes: Segunda Edição. **World Health Organization**. Geneva, 2016. 56 p.

Disponível em: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511575/en/>. Acesso em: 30 Jan. 2019.

WHO. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. **World Health Organization**. Geneva, 2016a. Disponível em: [http://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](http://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations). Acesso em: 28 Nov. 2018.

WICHMANN, O. et al. Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness. **Vaccine**, Países Baixos, v. 35, n. 42, p. 5535–5542, 9 October 2017.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 214, n. 5, p. S441 – S445, Dezembro 2016.

YADOULÉTON, A et al. Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. **Parasites & Vectors**, Inglaterra, v. 8, n. 17, p. 1-6, Janeiro 2015.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, Países Baixos, v. 63, p. 32-35, Fevereiro 2015.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 110, n. 4, p. 569-572, Junho 2015.

ZARA, ALSA. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão: **Epidemiologia Serviço Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, Abr-Jun 2016.

ZAVALA-CASTRO, JE. et al. Zika Virus Infection after Travel to Tahiti, December 2013. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 20, n. 8, p. 1412-1414, Agosto 2014.

ZAYED, A. et al. Detection of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* during 2011 outbreak in Al Hodayda, Yemen. **Acta Tropica**, Países Baixos, v. 123, n. 1, p. 62-66, Julho 2012.

ZHANG, H; DORR, GJ; HEWITT, AJ. Retention and efficacy of ultra-low volume pesticide applications on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Environmental Science And Pollution Research International**, Alemanha, v. 22, n. 21, p. 16492-501, Nov 2015.

Apêndice A - Termo para autorização para instalação de armadilhas e captura de mosquitos na área interna e externa da residência



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: **Zika, Dengue e Chikungunya: abordagem multidisciplinar para desenvolvimento de soluções aplicáveis em saúde pública**

Atividade: **Instalação de armadilhas e captura de mosquitos na área interna e externa da residência**

Os pesquisadores **Rodrigo Gurgel Gonçalves** e **Marcos Takashi Obara** pedem sua **autorização** para instalar armadilhas para coleta de mosquitos no seu domicílio e/ou realizar captura de mosquitos com auxílio de aspirador elétrico. O **objetivo** deste projeto é avaliar uma estratégia de controle de mosquitos com larvicida, o qual não é prejudicial para humanos nem animais domésticos. Com a sua autorização, estas armadilhas serão instaladas por **18 meses**. Durante este tempo, a equipe de pesquisa e/ou agentes de saúde realizarão **visitas domiciliares** uma a duas vezes por mês.

Este projeto está sendo desenvolvido por pesquisadores da **Universidade de Brasília e servidores da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal**.

Mesmo após sua autorização, você terá o **direito e a liberdade de retirar seu consentimento** em qualquer fase da pesquisa, independentemente do motivo e sem prejuízo do atendimento fornecido pela equipe. Você não terá nenhuma despesa e também nenhuma remuneração. Você será informado pessoalmente dos resultados da pesquisa. Ao auxiliar na realização deste estudo, **você ajudará no fornecimento de informações para a prevenção da dengue, zika e chikungunya**. Os resultados serão analisados e divulgados em relatórios e artigos científicos; a equipe do projeto também realizará atividades de divulgação dos resultados na própria comunidade. Contudo, sua identidade **será mantida em sigilo**, e não aparecerá em nenhum relatório, artigo ou qualquer outro meio de divulgação.

Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, pode fazer contato com o pesquisador Rodrigo Gurgel Gonçalves pelo telefone (61) 31071787 ou pelo E- mail: gurgelrgg@gmail.com

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu,, devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para a minha inclusão como participante da pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia deste documento.

Endereço:

.....
...../...../.....

Assinatura do entrevistado

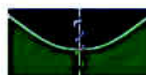
Data

.....
...../...../.....

Nome do profissional que realizou a atividade

Data

Apêndice B - Termo de autorização da instalação de potes para controle de mosquitos



GPS:

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

Projeto: Zika, Dengue e Chikungunya: abordagem multidisciplinar para desenvolvimento de soluções aplicáveis em saúde pública

Atividade: Instalação de potes para controle de mosquitos

Os pesquisadores **Rodrigo Gurgel Gonçalves** e **Marcos Takashi Obara** pedem sua **autorização** para instalar potes para controle de mosquitos no seu domicílio. O **objetivo** deste projeto é avaliar uma estratégia de controle de mosquitos com larvicida, o qual **não é prejudicial para humanos nem animais domésticos**. Com a sua autorização, potes com o larvicida serão instalados por **13 meses**. Durante este tempo, a equipe de pesquisa e/ou agentes de saúde realizarão **visitas domiciliares de no máximo 5 minutos** uma a duas vezes por mês.

Este projeto está sendo desenvolvido por pesquisadores da **Universidade de Brasília e servidores da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal**.

Mesmo após sua autorização, você terá o **direito e a liberdade de retirar seu consentimento** em qualquer fase da pesquisa, independentemente do motivo e sem prejuízo do atendimento fornecido pela equipe. Você não terá nenhuma despesa e também nenhuma remuneração. Você será informado pessoalmente dos resultados da pesquisa. Ao auxiliar na realização deste estudo, **você ajudará no fornecimento de informações para a prevenção da dengue, zika e chikungunya**. Os resultados serão analisados e divulgados em relatórios e artigos científicos; a equipe do projeto também realizará atividades de divulgação dos resultados na própria comunidade. Contudo, sua identidade **será mantida em sigilo**, e não aparecerá em nenhum relatório, artigo ou qualquer outro meio de divulgação.

Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, pode fazer contato com o pesquisador **Rodrigo Gurgel Gonçalves** pelo telefone (61) 31071787 ou pelo E-mail: gurgelrgg@gmail.com

Eu, devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para a minha inclusão como participante da pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia deste documento.

Endereço:

.....
Assinatura do entrevistado

.....
Data

.....
Nome do profissional que realizou a atividade

.....
Data

Apêndice C - Informativo aos participantes do projeto



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

INFORMATIVO AOS PARTICIPANTES DO PROJETO:

Zika, Dengue e Chikungunya: abordagem multidisciplinar para desenvolvimento de soluções aplicáveis em saúde pública

O objetivo do projeto foi avaliar uma maneira de controlar os mosquitos com um inseticida espalhado por mosquitos e verificar se os mosquitos estavam infectados pelos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya.

Métodos: na área de intervenção (Residencial Oeste) instalamos 150 estações com inseticida (PPF), um poderoso larvicida que não é prejudicial para humanos e animais domésticos; as estações receberam manutenção mensal (reposição de água e PPF) entre março de 2017 e março de 2018. Entre janeiro de 2017 e junho de 2018 coletamos mensalmente (usando aspiradores elétricos e armadilhas de ovos) mosquitos em 30 residências (dentro e ao redor das casas) no Residencial Oeste e 30 residências em uma área sem aplicação do inseticida (Bosque), mas com características parecidas (quintais e estrutura da casa). As fêmeas dos mosquitos *Ae. aegypti* capturadas foram analisadas para verificar se estavam infectadas pelos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya. Os resultados do projeto seguem abaixo:

Resultados da aspiração de mosquitos adultos: Os mosquitos foram identificados como *Ae. aegypti* (835 indivíduos, mosquito da dengue) e *Cx. quinquefasciatus* (3641 indivíduos, pernilongo comum ou muriçoca). O número de mosquitos adultos capturados foi parecido nas duas áreas antes da instalação das estações; diminuiu no Residencial Oeste mas não no Bosque durante a aplicação de PPF; e aumentou no Bosque mas não no Residencial Oeste nos três meses posteriores à retirada das estações. **As capturas mensais de *Ae. aegypti* no Residencial Oeste diminuíram mais de 80% durante a instalação das estações** (antes de 19 mosquitos capturados por hora, para 6 por hora). No Bosque registramos uma diminuição de quase 50% (6 para 3 mosquitos/hora) ao comparar os mesmos períodos. Estes resultados indicam que estações com PPF diminuíram o número de mosquitos nas casas estudadas.

Resultados da aspiração de mosquitos adultos: Os mosquitos foram identificados como *Ae. aegypti* (835 indivíduos, mosquito da dengue) e *Cx. quinquefasciatus* (3641 indivíduos, pernilongo comum ou muriçoca). O número de mosquitos adultos capturados foi parecido nas duas áreas antes da instalação das estações; diminuiu no Residencial Oeste mas não no Bosque durante a aplicação de PPF; e aumentou no Bosque mas não no Residencial Oeste nos três meses posteriores à retirada das estações. **As capturas mensais de *Ae. aegypti* no Residencial Oeste diminuíram mais de 80% durante a instalação das estações** (antes de 19 mosquitos capturados por hora, para 6 por hora). No Bosque registramos uma diminuição de quase 50% (6 para 3 mosquitos/hora) ao comparar os mesmos períodos. Estes resultados indicam que estações com PPF diminuíram o número de mosquitos nas casas estudadas.

Resultados das armadilhas de ovos: foram contabilizados quase 44 mil ovos em 458 armadilhas positivas nas duas áreas. Houve pouca diminuição na quantidade de ovos no Residencial Oeste, contrastando com a clara diminuição no número de mosquitos, indicando que as armadilhas de ovos e são pouco úteis na avaliação do controle de mosquitos urbanos utilizando estações de PPF.

Resultados da infecção viral de *A. aegypti*: Das 196 amostras de mosquitos, 6 foram positivas para os vírus da dengue, Zika e chikungunya no Residencial Oeste e Bosque em 2017 e 2018, nos meses chuvosos.

Conclusões: Os larvicidas espalhados por mosquitos são muito importantes para o controle de mosquitos na cidade. Há a circulação dos vírus da dengue, Zika e chikungunya em mosquitos *A. aegypti* em São Sebastião.

Recomendações: Apesar da baixa infecção nos mosquitos, torna-se fundamental a colaboração da população para eliminar os criadouros de mosquitos como pneus, vasos de planta, garrafas, entulho/lixo além de manter vedados reservatórios de água como caixas d'água, cisternas/fossas e limpar calhas, piscinas e ralos.

Se você quiser saber mais detalhes dos resultados da pesquisa, pode fazer contato com o pesquisador Rodrigo Gurgel Gonçalves pelo telefone (61) 31071787 ou pelo E-mail: gurgelrgg@gmail.com. **Agradecemos sua participação no projeto.** Esperamos que essa maneira de controle seja avaliada em outras áreas do Brasil e que futuramente ela seja recomendada pelo Ministério da Saúde para controle de mosquitos nas cidades.

Cordialmente,

Rodrigo Gurgel Gonçalves – Coordenador do projeto, UnB

