UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

ADRIANO FERNANDES TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS VÍRUS DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EM LARVAS DE *AEDES* COLETADOS *IN NATURA* E DOCUMENTAÇÃO DE TRANSMISSÃO VERTICAL SIMULTÂNEA

Vitória da Conquista, BA
2020

ADRIANO FERNANDES TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS VÍRUS DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EM LARVAS DE *AEDES* COLETADOS *IN NATURA* E DOCUMENTAÇÃO DE TRANSMISSÃO VERTICAL SIMULTÂNEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Freire de Melo
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta
Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz

Vitória da Conquista, BA
2020

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

T266

Teixeira, Adriano Fernandes.
Avaliação da presença dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya em larvas de *Aedes* coletados *in natura* e documentação de transmissão vertical simultânea. /Adriano Fernandes Teixeira. - 2020
77 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Freire de Melo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2020.

1. *Aedes*. 2. Infecção por Zika vírus. 3. Febre de Chikungunya. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Melo Fabricio Freire de III. Título.

CDU: 616.9 (813.8)

Elaborado por Marcos Aurélio Ribeiro da Silva CRB5/1858

ADRIANO FERNANDES TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS VÍRUS DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EM LARVAS DE *AEDES* COLETADOS *IN NATURA* E DOCUMENTAÇÃO DE TRANSMISSÃO VERTICAL SIMULTÂNEA

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.
Vitória da Conquista – BA, 2020.

Fabrício Freire de Melo

Prof. Dr. Fabricio Freire de Melo
Instituto Multidisciplinar em Saúde
Universidade Federal da Bahia da Bahia

Paulo Pimenta

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta
Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz

Baqueiro

Profª. Drª. Tiana Baqueiro Figueiredo
Instituto Multidisciplinar em Saúde
Universidade Federal da Bahia da Bahia

Bárbara Aparecida Chaves

Profª. Drª. Barbara Aparecida Chaves
Instituto de Pesquisa Clínicas Carlos Borborema
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira

À minha esposa, por todo apoio e paciência durante todo esse período. À minha família por estarem sempre presentes, mesmo que em pensamento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram durante esta jornada, em especial:

À minha esposa, Anna Clara.

Aos meus pais, Messias e Luciene.

Aos meus irmãos, Leonor, Emanuelle e Teixeira.

Ao meu orientador, Prof. Fabricio.

A todos os professores da UFBA que contribuíram para o meu processo de aprendizagem em todos os cenários.

Aos professores da FIOCRUZ, Dr. Paulo Pimenta e Dra. Nágila Secundino.

Aos meus colegas de mestrado da UFBA que foram essenciais nos meus compromissos acadêmicos, em especial Thiago Macedo.

Aos meus colegas de trabalho que por companheirismo me ajudaram nos meus afazeres diários, em especial Fillipe.

Ao amigo Breno por todo apoio e disponibilidade na escrita dos artigos e ao longo de todo o projeto.

Aos alunos em iniciação científica Felipe, Maria Luiza e Juliana e Airton.

À Universidade Federal da Bahia e ao Programa de pós-graduação em Biociências pela oportunidade de realização do mestrado.

Este trabalho foi financiado pelo programa PPSUS da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); a Fundação Oswaldo Cruz, o Conselho Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Apoio à Fundação de Amparo à Pesquisa

do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), B.B.B e M.L.C.S.); o Programa de Apoio à Universidade Federal da Bahia para Jovens Professores Doutores (PROPESQ-UFBA); o programa da Universidade Federal da Bahia Permanecer (Apoio à F.A.F.S.); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM / PAPAC), (FAPEAM / Pró-Estado); e a Coordenação Brasileira de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (apoio ao B.A.C.).

TEIXEIRA, A. F. **Avaliação da presença dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya em larvas de *Aedes* coletados *in natura* e documentação de transmissão vertical simultânea**. 77f. 2020. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2020.

RESUMO

Dengue, Zika e Chikungunya são doenças causadas por arbovírus e possuem grande importância para a saúde pública mundial. O *Aedes aegypti* é o vetor mais importante para as arboviroses no Brasil. Os três arbovírus circulam de forma simultânea nas mesmas regiões geográficas em associação ao *Aedes aegypti*, levando a custos consideráveis aos serviços de saúde e morbidade significativa à população. Considerando que o papel dos vetores é essencial para a disseminação dos arbovírus e a perpetuação dos patógenos na natureza, é necessário compreender aspectos de sua biologia relacionados principalmente a reprodução. A transmissão vertical possibilita a manutenção da circulação viral em momentos de baixa densidade populacional do vetor, como estações com pouca pluviosidade e temperaturas inadequadas para proliferação do mosquito. O estudo da transmissão transovariana de arboviroses por meio da avaliação de ovos coletados na natureza utilizando ovitrampas permite identificar de forma precoce a circulação viral e entender aspectos locais da interação mosquito, vetor e hospedeiro. O objetivo do estudo foi identificar a circulação dos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue através de larvas obtidas de ovos coletados em ovitrampas em Vitória da Conquista. A cidade foi dividida em 5 regiões administrativas (Norte, Sul, Leste, Oeste e Centro) para melhor entendimento dos eventos, considerando o escore obtido com o Índices de Infestação de *Aedes aegypti* (LIRAa) de cada região. A coleta dos ovos ocorreu entre os meses de abril a maio de 2019. Os ovos foram eclodidos e as larvas foram alimentadas com ração de peixe até os estágios de L2 a L3. O RNA viral foi extraído das larvas e acondicionado a -70 ºC até a síntese de cDNA. A amplificação do material genético ocorreu utilizando o sistema TaqMan 2x Universal PCR Master Mix a partir de primers e sondas específicas. Observou-se que 74% das ovitrampas foram positivas para presença de ovos e em 60% destas possuíam larvas viáveis. No total, foram obtidas 450 larvas que foram distribuídas em 30 pools de 25 larvas. Além disso, 30 larvas foram avaliadas de forma individual. 53% dos pools foram positivos para um dos arbovírus, 26% dos pools foram positivos para o ZIKV, 13% para CHIKV e 10% para DENV. Houve a presença simultânea de CHIKV e ZIKV em um pool (3,3%). Quando as larvas foram avaliadas de forma individual, foi detectado a presença de vírus em 30% das amostras, sendo 13% positivas para DENV e 3,3% ZIKV. A transmissão simultânea de DENV e ZIKV foi detectada em quatro larvas (13,3% das amostras) com maior número de cópias virais para o ZIKV. O estudo demonstrou correlação entre o escore de LIRAa e a presença de arbovírus. Documentado a cocirculação de forma heterogênea de DENV, ZIKV e CHIKV em diferentes regiões de Vitória da Conquista e comprovado a correlação entre o escore de LIRAa e a presença viral. A constatação de transmissão vertical permite entender a perpetuação viral no contexto das características climáticas regionais. De forma surpreendente, foi identificado cotransmissão transovariana de DENV e ZIKV na natureza, com maior número de cópias virais para ZIKV

Palavras-chave: Coinfecção; Cotransmissão; Transmissão transovariana; *Aedes aegypti*; Vírus Zika; Vírus da Dengue; Vírus Chikungunya

TEIXEIRA, A. F. **Avaliação da presença dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya em larvas de *Aedes* coletados *in natura* e documentação de transmissão vertical simultânea**. 77f. 2020. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2020.

ABSTRACT

Dengue, Zika and Chikungunya are arboviruses of great importance for public health worldwide. *Aedes aegypti* is the principal vector for arboviruses in Brazil. The three arboviruses circulate simultaneously in the same geographic regions in a synergistic with for Aedes aegypti, leading to considerable costs to health services and significant morbidity in the population. *Aedes aegypti* is essential for the spread of arboviruses and the perpetuation of the pathogen in nature, it is necessary to understand the aspects of its reproduction. The aim of the study was to identify the circulation of Zika virus (ZIKV), Chinkungunya virus (CHIKV) and Dengue virus (DENV) in larvae hatched from eggs collected from traps (ovitramps) in Vitória da Conquista. The city was divided into 5 administrative regions. The Municipal Health Department guides the distribution of 50 ovitramps, according to the score, with the Rapid Study of Infestation Indexes by Aedes aegypti (LIRAa) of each region. Egg collection took place between the months of April and May 2019. The eggs were matured and the larvae were fed fish food up to levels L2 to L3. Viral RNA was extracted from larvae and stored at -70 ºC until cDNA synthesis. An amplification of the genetic material occurred using the TaqMan 2x Universal PCR Master Mix system (Thermo Fisher Scientific, USA). There were 74% of ovitraps to be positive for the presence of eggs and 60% of these viable larvae. In total, 450 larvae were distributed in 30 pools of 25 larvae. In addition, 30 larvae were assessed individually. Fifty-three percent of the pools were positive for one of the arboviruses, 26% of the pools were positive for ZIKV, 13% for CHIKV and 10% for DENV. When the larvae were evaluated individually, the presence of a virus was detected in 30% of the samples, 13% positive for DENV and 3.3% ZIKV. Surprisingly, a co-transmission of DENV and ZIKV was detected in four larvae (13.3% of the samples) with the highest number of copies for ZIKV. There was a correlation with statistical significance between the LIRAa score and the presence of arboviruses in different regions. These data prove the co-circulation, presence of individual vertical transmission of DENV, ZIKV and CHIKV and transovarian co-transmission of DENV and ZIKV in nature

Keywords: Coinfection; Cotransmission; Transovarial transmission; Aedes aegypti; Zika virus; Dengue virus; Chikungunya virus.

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1. Coeficiente de Infecção (CI) de arboviroses por região 14

Figura 2. Fêmea do *Aedes aegypti* 17

Figura 3. Distribuição global do Ae. Aegypit. O mapa descreve a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) a 1 (vermelho) em uma resolução espacial de 5 x 5km 18

Figura 4. Fases de desenvolvimento do *Aedes* 19

Figura 5. Pupas do *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* 20

Figura 6. Morfologia do *Aedes Albopictus* 21

Figura 7. Distribuição global do *Ae. Albopictus*. O mapa descreve a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) a 1 (vermelho) em uma resolução espacial de 5 x 5km 22

Figura 8. Lavitrampa 24

Figura 9. Trajeto (representado por linhas) e locais de desenvolvimento do vírus (representado por letras) no mosquito. Após a ingestão de uma refeição de sangue (A), todos os vírus entram no intestino médio (B). [...] 32

Figura 10. Fórmula da capacidade vetorial descreve o número total de picadas infecciosas futuras decorrentes de mosquitos que picam um hospedeiro infeccioso individual em um único dia. [...] 33

Figura 11. A coinfecção pode ser resultado da transmissão simultânea de vários vírus entre mosquitos e humanos ou transmissão sequencial durante várias picadas de mosquito. [...] 36

Figura 12. Cinco Regiões administrativas 44

Figura 13. Armadilha para coleta dos ovos 45

Figura 14. Distribuição das ovitrampas entre as cinco regiões administrativas conforme positividade de LIRAa 46

Capítulo 1

Figura 1. Ovitraps location and arboviruses detection..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos confirmados por arbovirose 40

Tabela 2. Primers e sondas utilizados para amplificação do DNA viral de cada arbovírus. DENV: vírus da dengue; ZIKV: vírus da Zika; CHIKV: Vírus do Chikungunya 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHIKV	Vírus do Chikungunya
DENV	Vírus da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
IB	Índice de Breteau
IIP	Índice de Infestação Predial
ITR	Índice por tipo de recipiente
LIRAa	Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypt*
PIE	Período de Incubação Extrínseco
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction*)
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês, *ribonucleic acid*)
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction- real time*)
TOT	Transmissão Transovariana
ZIKV	Vírus da Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1 *AEDES AEGYPTI* 16
2.1.1 História 16
2.1.2 Morfologia e Biologia 17
2.2 *AEDES ALBOPICTUS* 21
2.3 PESQUISA ENTOMOLÓGICA 22
2.4 ARBOVÍRUS 25
2.4.1 Dengue 26
2.4.2 Zika 27
2.4.3 Chikungunya 28
2.5 COMPETÊNCIA VETORIAL E CAPACIDADE VETORIAL 30
2.6 COINFECÇÃO E COTRANSMISSÃO DE ARBOVIROSES 34
2.7 TRANSMISSÃO VERTICAL 36
3 JUSTIFICATIVA 40
4 OBJETIVOS 42
4.1 OBJETIVO GERAL 42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 42
5 METODOLOGIA 43
5.1 ÁREA DO ESTUDO 43
5.2 MÉTODOS 44
5.2.1 Armadilha para coleta de ovos 44
5.2.2 Coleta dos ovos e eclosão 45
5.2.3 Extração do RNA viral 46
5.2.4 Síntese do cDNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) ... 47
5.2.5 Análise estatística 48
REFERÊNCIAS 49
CAPÍTULO 1 55
CONSIDERAÇÕES FINAIS 79
ANEXO 1 80

1 INTRODUÇÃO

As infecções por arbovírus têm sido consideradas um problema de saúde pública mundial. Nos últimos anos, o número de epidemias por estes patógenos aumentou de forma significativa (WEAVER *et al.*, 2018). O crescimento de casos de arboviroses em seres humanos pode ser atribuído a diversos fatores, tais como a intensificação da agricultura, mudanças climáticas, urbanização desorganizada e alteração do comportamento das populações que possibilitaram a proliferação e disseminação dos vetores (GOULD *et al.*, 2017).

Cerca de 135 arbovírus causam doenças em humanos, sendo que os sintomas clínicos podem variar de indivíduos assintomáticos até situações críticas com quadros fulminantes (GOULD *et al.*, 2017). No Brasil, o vírus da dengue (DENV), da ZIKA (ZIKV) e do Chikungunya (CHIKV) são endêmicos e, frequentemente, encontram-se circulando de forma simultânea no mesmo espaço geográfico (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

A circulação dessas arboviroses está fortemente relacionada à presença do *Aedes aegypti*, seu principal vetor. Os fatores que influenciam na proliferação do *Aedes aegypti* são semelhantes aos que interferem na disseminação dos arbovírus como: clima, ecologia e condições econômicas. Desta forma, existe um sinergismo entre hospedeiro e vetor (VOGELS *et al*., 2019) que é potencializado pelas condições socioambientais das cidades brasileiras (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017).

O hospedeiro e o vetor podem estar infectados por mais de uma arbovirose. A coinfecção por mais de um vírus é descrita em até 25% da população humana das áreas acometidas (VOGELS *et al.*, 2019). O provável efeito da cocirculação e coinfecção na manifestação da doença causada no hospedeiro ainda não é bem compreendido (PESSOA *et al.*, 2016). O quadro clínico das arboviroses é semelhante, dificultando o diagnóstico diferencial, mesmo com uso de exames laboratoriais. Considerando esses fatores, pode haver subnotificação de determinada doença na presença de cocirculação e coinfecção (GOULD *et al.*, 2017; VOGELS *et al.*, 2019).

A interação entre os diferentes arbovírus durante a coinfecção pode levar implicações epidemiológicas (VOGELS *et al.*, 2019). A competência vetorial pode ser influenciada quando há presença de mais de um patógeno no vetor (CHAVES *et al.*, 2018; RÜCKERT; EBEL, 2018). Desta forma, o principal mecanismo de manutenção das arboviroses, que é a transmissão horizontal, pode estar alterado nestas circunstâncias. Por outro lado, pouco se sabe sobre cocirculação e coinfecção na transmissão vertical que é reconhecidamente um importante mecanismo para perpetuação do vírus nos períodos interepidêmicos (KUNO; CHANG, 2005).

As arboviroses, em especial, Dengue, Zika e Chikungunya têm acometido de forma recorrente a população brasileira. O Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde publicou o número de casos de arboviroses diagnosticados no Brasil de janeiro até março de 2020. Houve 390.684 novos casos de dengue, 11.453 novos casos de Chikungunya e 1.395 casos prováveis de Zika. Até esta data, no Brasil tinham sido relatadas 106 mortes por Dengue e 2 mortes por Chikungunya (BRASIL, 2020).

No estado da Bahia o número de casos também é expressivo. Até a Semana 6 Epidemiológica do ano de 2020, tinham sido notificados 2.596 casos suspeitos de dengue, sendo 3 casos classificados como graves e 24 casos com sinais de alarme. Haviam sido notificados 644 casos suspeitos de Zika e 85 casos prováveis de Zika. A figura 1 coloca a cidade de Vitória da Conquista com o coeficiente de arboviroses de 100 a 300 casos por/100.000 habitantes, demonstrando a importância que as arboviroses tem na região estudada (BAHIA, 2020).

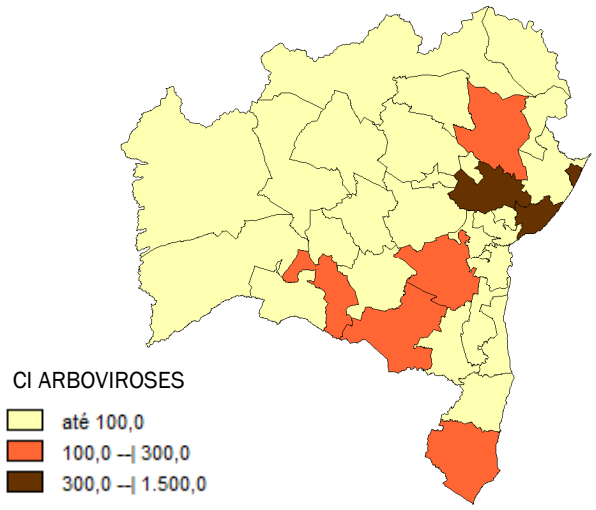


Figura 1. Coeficiente de Infecção (CI) de arboviroses por região
Fonte: Adaptado de Bahia (2020).

O grande número de casos de arboviroses implica em um impacto financeiro relevante. Os gastos com essas doenças podem ser categorizados em custos médicos diretos e custos indiretos, pois os arbovírus são capazes de levar a quadros incapacitantes que diminuem a capacidade de trabalho da população. Foi calculado que apenas em 2016, o Brasil gastou cerca de 2,3 bilhões de reais no manejo das arboviroses, sendo que 65% deste valor foi destinado ao combate do vetor e outros 16% para os custos médicos diretos. Os custos indiretos foram responsáveis por 19% do valor total (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017).

Uma das estratégias para reduzir o número de casos no mundo endêmico e reduzir o impacto das arboviroses na sociedade é o controle dos vetores (FOCKS, 2004). A presença e a densidade do vetor primário *Aedes aegypti* são indicadores usados para avaliar a necessidade de ações de controle de vetores (BRAGA; VALLE, 2007; GOMES, 1998). O uso de armadilhas para monitorar a distribuição espacial e temporal do vetor e circulação viral tem se constituído como um excelente instrumento, não só pelo baixo custo e facilidade de uso, mas principalmente pela sensibilidade e especificidade na coleta (COSTA *et al.*, 2017).

Considerando que Vitória da Conquista é região endêmica para Dengue, Zika e Chikungunya, o estudo foi desenhado para avaliar a transmissão vertical e a circulação de DENV, ZIKV e CHIKV em diferentes regiões da cidade por meio da coleta de ovos em um período interepidemico. Um melhor conhecimento do comportamento e interação das arboviroses no contexto local pode ser útil para o desenho de intervenções por parte da autoridade sanitária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aedes aegypti*

2.1.1 História

Estudar o passado recente do *Aedes aegypti* é importante para entender o comportamento das doenças que são transmitidas por esse mosquito (POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018). No entanto, a pesquisa do passado do *Aedes aegypti* não tem sido uma tarefa muito fácil, devido à falta de consistência no uso dos nomes das espécies, juntamente com a ausência de vigilância de mosquitos entre os anos de 1500 e 1900. A denominação *Aedes aegypti* foi usado pela primeira vez por Linnaeus em 1762 para um mosquito que provavelmente não era o que hoje é reconhecido como essa espécie (MATTINGLY, 1958).

Várias linhas de evidência indicam que o *Ae. Aegypti* é oriundo da África (CARVALHO; MOREIRA, 2017). Sua forma ancestral africana é chamada de *Ae. aepypti formosus* (LOUNIBOS, 1981). O *Aedes aegypti formosus* é oriundo das florestas tropicais africanas e se disseminou para os ambientes urbanos no norte da África ou no Oriente Próximo (POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018). Um marco determinante para urbanização do mosquito foi quando esse passou a usar a água de recipientes humanos, resultando na forma "domesticada" denominada *Aedes aegypti aegypti* (POWELL; TABACHNICK, 2013). As fêmeas que saíam de tais recipientes na estação seca não teriam escolha a não ser ovipositar em recipientes de água gerados pelo homem. Os novos mosquitos também desenvolveram a afinidade pelo sangue humano (LOUNIBOS, 1981). As atividades comerciais posteriormente introduziram *Ae. ae. aegypti* em todo o mundo tropical e subtropical. *Aedes ae. aegypti* provavelmente foi disseminado para o Novo Mundo da África Ocidental por meio do comércio de escravos na África entre os séculos XVI e XIX (MATTINGLY, 1958; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018).

O *Aedes aegypti* ganhou notoriedade entre as mais de três milhões e meio de espécies de mosquitos por sua capacidade de transmitir doenças com grande impacto para saúde pública. Em uma correspondência publicada pela revista *Nature* um autor chega a considerar o *Aedes aegypti* como um dos animais mais letais do planeta (POWELL, 2016). Esse animal foi o vetor responsável pela disseminação da febre amarela e, mais recentemente, tem sido o principal

vetor da pandemia de arboviroses composta pela Dengue, Chikungunya e Zika (PEREIRA *et al.*, 2006; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018).

2.1.2 Morfologia e Biologia

O mosquito *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) pertence a CLASSE Hexapoda (três pares de patas), ORDEM Díptera (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), FAMÍLIA Culicidae e GÊNERO Aedes (BRASIL, 2001).

O *Aedes aegypti* adulto é escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), no entanto, existe uma variação na coloração podendo chegar a marrom claro (CARVALHO; MOREIRA, 2017). A imagem se assemelha muito as outras espécies de culcídeos, podendo ser diferenciado do Culex por determinados aspectos do abdome e garras. A cabeça é pequena, arredondada e com olhos proporcionalmente grandes. O pescoço é membranoso e o tórax relativamente grande para acomodar os músculos das asas. O abdome é dividido em segmentos (CHRISTOPHERS, 1960).

O macho tem morfologia diferenciada da fêmea, característica comum dos mosquitos (CHRISTOPHERS, 1960). A fêmea (Figura 2) é maior (CARVALHO; MOREIRA, 2017), com quase o dobro do peso e muito mais robusta em comparação ao macho.(CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O macho também difere da fêmea por possuir apenas mandíbulas rudimentares, sem hipofaringe distinta, asas mais estreitas em proporção ao seu comprimento e uma franja mais desenvolvida (CHRISTOPHERS, 1960).

Figura 2. Fêmea do *Aedes aegypti*
Fonte: Adaptado de Vairo *et al.* (2019).

O *Aedes aegypti* predomina nas zonas tropical e subtropical, especialmente entre as latitudes 35ºN e 35ºS, como pode ser evidenciado na Figura 3, que descreve a probabilidade de ocorrência deste mosquito (BRASIL, 2001; FARNESI *et al.*, 2009; KRAEMER *et al.*, 2015).

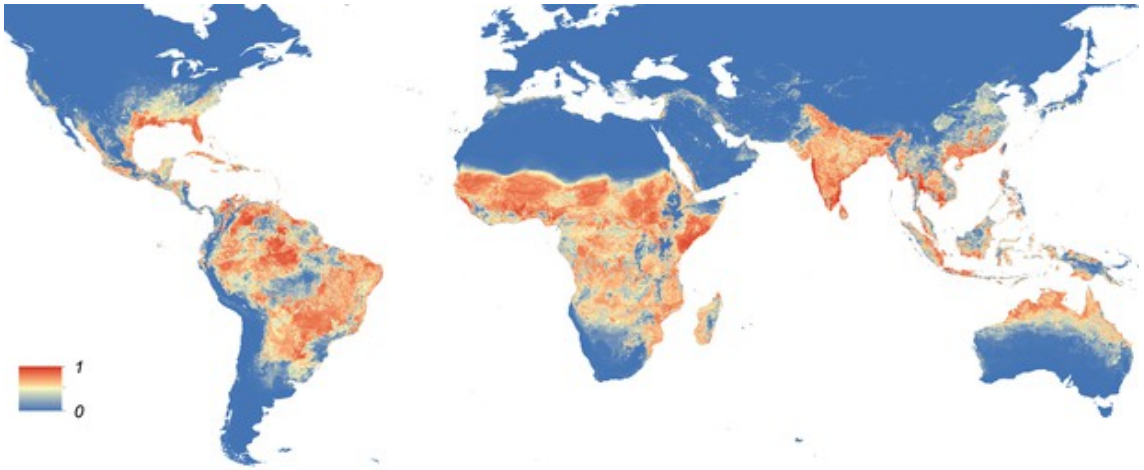


Figura 3. Distribuição global do Ae. Aegypit. O mapa descreve a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) a 1 (vermelho) em uma resolução espacial de 5 x 5km
Fonte: Adaptado de Kraemer *et al.* (2015).

O *Aedes aegypti* pode manter uma população razoável em qualquer época do ano, porém sua densidade populacional é aumentada pela presença de chuvas. O *Aedes aegypti* pode realizar o repasto em humanos e animais em qualquer hora do dia, mas possui preferência por humanos e atividade diurna (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2009).

O macho alimenta-se de carboidratos extraídos dos vegetais. As fêmeas, apesar de hematófogas, também podem se alimentar da seiva das plantas. Embora muitas espécies pareçam preferir se alimentar e se reproduzir ao ar livre, o *Aedes aegypti* tem estreita associação com seres humanos e depositam seus ovos próximos aos domicílios após o repasto (BRASIL, 2001; CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

O criadouro preferencial do *Aedes aegypti* são recipientes artificiais utilizados para armazenar água ou abandonados que, por sua vez, acabam por acumular água incidentalmente. A proliferação do mosquito está condicionada a presença de água limpa, não turva, em regiões sombreadas e pobre em matéria orgânica em decomposição. O fundo ou as paredes dos recipientes devem ser escuros para criar um ambiente favorável. Além disso, tem sido documentada a proliferação do *Aedes aegypti* em recipientes naturais como em bromélias e ocos de árvores. As fêmeas colocam os ovos nas paredes internas dos recipientes fora da água,

acima de sua superfície (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Objetos fabricados pelo homem, como panelas de barro, recipientes de plástico e pneus, são locais comuns de postura de ovos (BRASIL, 2001).

As espécies raramente são encontradas em piscinas ou coleções de água no solo, como poços ou ralos de terra, nos quais todas as bordas são de terra ou lama. A ausência de ovoposição em tais situações é atribuída à vulnerabilidade das larvas a inimigos naturais. A fêmea prefere condições em que ela pode depositar seus ovos em alguma situação de abrigo (CHRISTOPHERS, 1960).

Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa. O ciclo de vida dos mosquitos *Aedes* consiste em quatro estágios (ovo, larva, pupa e adulto) como ilustrado na Figura 4. O tempo para formação dos adultos pode ser de sete dias a várias semanas após a eclosão dos ovos. Após emergir, o inseto permanece na parede do recipiente por horas para o endurecimento do exoesqueleto e asas. O acasalamento ocorre durante o voo e uma única inseminação pode fecundar todos os ovos da fêmea. Os adultos vivem em média de 30 a 35 dias (BRASIL, 2007).

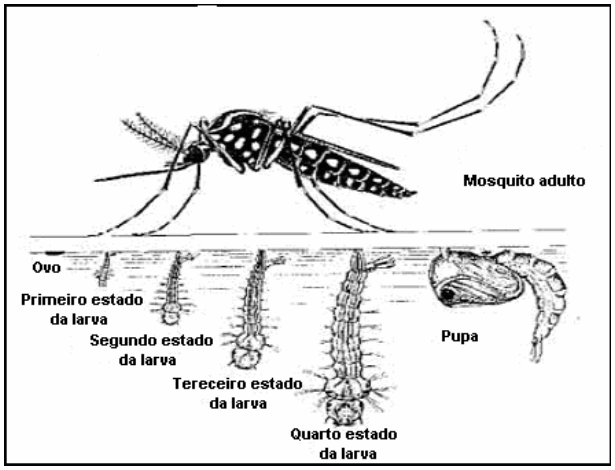


Figura 4. Fases de desenvolvimento do *Aedes*
Fonte: Adaptado de Brasil (2007).

A fecundação exige condições favoráveis de umidade e temperatura e ocorre durante a postura. O processo de formação dos ovos tem duração de 48 horas, uma vez concluído, os ovos se tornam resistentes por longos períodos e a condições adversas do meio ambiente. Já foi observado a eclosão de ovos após 450 dias da oviposição. Esta propriedade é um obstáculo para erradicação da espécie e cria condições favoráveis para a sua disseminação de forma passiva (BRASIL, 2007).

Os ovos, inicialmente, são da cor branca e rapidamente se tornam negros e brilhantes. Os ovos do *Aedes aegypti* medem, aproximadamente, 1mm de comprimento e tem um contorno alongado e fusiforme A eclosão dos ovos depende da presença de água e na sua ausência pode permanecer viável por até mais de um ano (CARVALHO; MOREIRA, 2017).

As larvas amadurecem em quatro estágios evolutivos (CARVALHO; MOREIRA, 2017), em um processo que pode levar de cincos dias a semanas, dependendo do criadouro e condições ambientais. A larva pode ser dividida em 3 partes: cabeça, tórax e abdome. A respiração ocorre pela parte abdominal, quando a larva vem para a superfície e fica quase em posição vertical (BRASIL, 2001).

A transformação do estágio larval para adulto ocorre na forma de pupa. Essa tem a forma de vírgula e pode ser dividida em cefalotórax e abdome como ilustrado na Figura 5. Durante esse período, que dura de 2 a 3 dias, a pupa não se alimenta (BRASIL, 2001; CHRISTOPHERS, 1960).

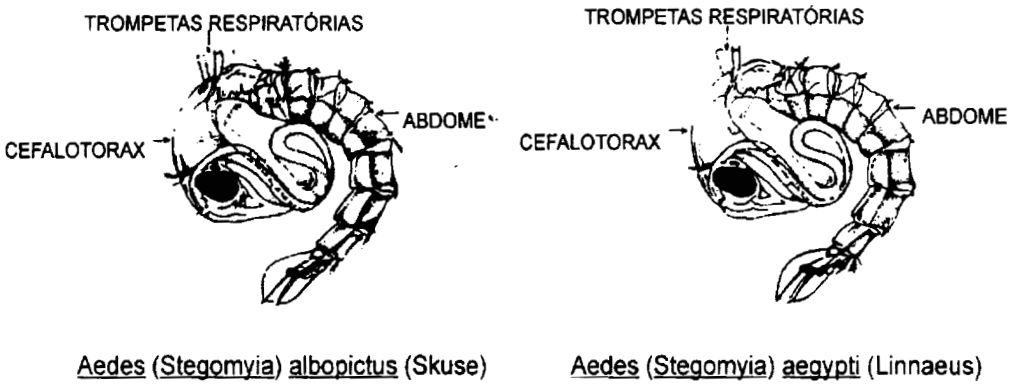


Figura 5. Pupas do *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*
Fonte: Adaptado de Brasil (2001).

A proliferação da espécie necessita de algumas condições como uma refeição de sangue pela fêmea para formação dos ovos e presença de água com condições adequadas para desenvolvimento da larva. Apesar da capacidade de voo do *Aedes aegypti* ser de 100 metros, a fêmea pode voar por até 1000 metros procurando um ambiente adequado. O repasto sanguíneo das fêmeas fornece proteínas para o desenvolvimento dos ovos. A fêmea se alimenta mais de uma vez entre duas sucessivas posturas, em especial quando perturbada antes de totalmente ingurgitada. A umidade e temperatura são fatores importantes para o desenvolvimento do *Aedes aegypti* adulto. As habitações urbanas humanas e sua circunvizinhança oferecem condições ideais para a espécie (BRASIL, 2001; CHRISTOPHERS, 1960)

A temperatura ambiente alta favorece a espécie e, mesmo quando muito elevada, o mosquito e a larva podem ter condições climáticas menos desfavoráveis dentro das habitações e próximos a locais úmidos. A baixa temperatura pode até limitar a existência das espécies, como foi demonstrada em relação à sua distribuição geográfica. Embora a temperatura ao ar livre possa ser baixa, as condições nos edifícios podem oferecer proteção (CHRISTOPHERS, 1960).

A fêmea do *Ae. Aegypti* possui a habilidade de perceber qualquer movimento das vítimas, abandonando-as rapidamente. O mosquito volta a atacar ou procura outra vítima logo em seguida. Essa capacidade acaba por levar a fêmea a se alimentar de vários indivíduos, aumentando sua capacidade de disseminar doenças durante o repasto (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

2.2 *Aedes Albopictus*

O *Aedes albopictus* é outro vetor relevante das arboviroses no Brasil. É oriundo da Ásia, por isso é conhecido como tigre asiático. A sua disseminação pelo mundo ocorreu de forma passiva, assim como *Ae Aegypti*; porém de forma mais tardia, após a Segunda Guerra Mundial. A espécie foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1986, no município de Itaguaí, no estado do Rio de Janeiro (GOMES, 1998; KRAEMER *et al.*, 2019).

O *Aedes albopictus* tem morfologia diferente do *Aedes Aegypti*, com cor mais enegrecida. As patas possuem anéis prateados. O corpo, assim como o *Aedes Aegypti,* apresenta escamas prateadas como ilustrado na Figura 6. O dorso possui uma seta prateada (BRASIL, 2001).

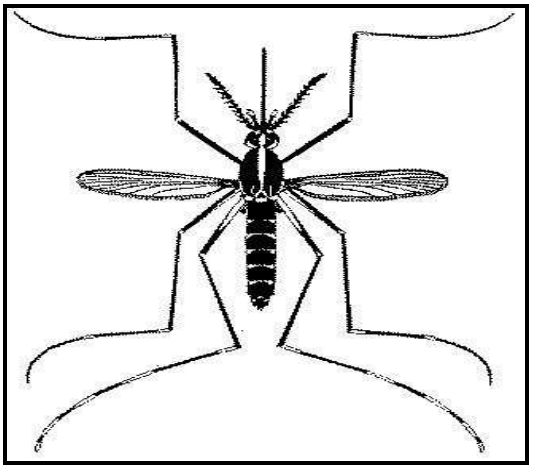


Figura 6. Morfologia do *Aedes Albopictus*

Fonte: Adaptado de Brasil (2001).

O *Aedes albopictus* possui hábitos diurnos, domiciliares e se reproduz em criadouros como jarros, tambores e pneus. No entanto, é encontrado com frequência no meio rural em ocos de árvores, imbricação de folhas e orifícios de bambus. Desta forma, pode ser encontrado em regiões com baixa densidade populacional apesar de competir com *Aedes aegypti* em regiões urbanizadas. Uma das características que o diferencia do *Aedes aegypti* é a maior tolerância ao frio (BRASIL, 2001; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As fêmeas de *Aedes albopictus* frequentemente depositam seus ovos aos poucos, em vários recipientes diferentes, o que facilita a dispersão da espécie. A biologia dessa espécie é muito semelhante do *Aedes Agypti* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As preferências com relação as condições ambientais dos Aedes influenciam sua distribuição pelo mundo. O *Aedes aegypti* ocorre principalmente nos trópicos e subtópicos, com concentrações no norte do Brasil e sudeste da Ásia. A distribuição de *Ae. albopictus* se estende até o sul da Europa, norte da China, sul do Brasil, norte dos Estados Unidos e Japão conforme ilustrado na Figura 7. Isso reflete a distribuição atual e histórica da *Aedes albopictus* e a capacidade das espécies de tolerar temperaturas mais baixas (KRAEMER *et al.*, 2015).

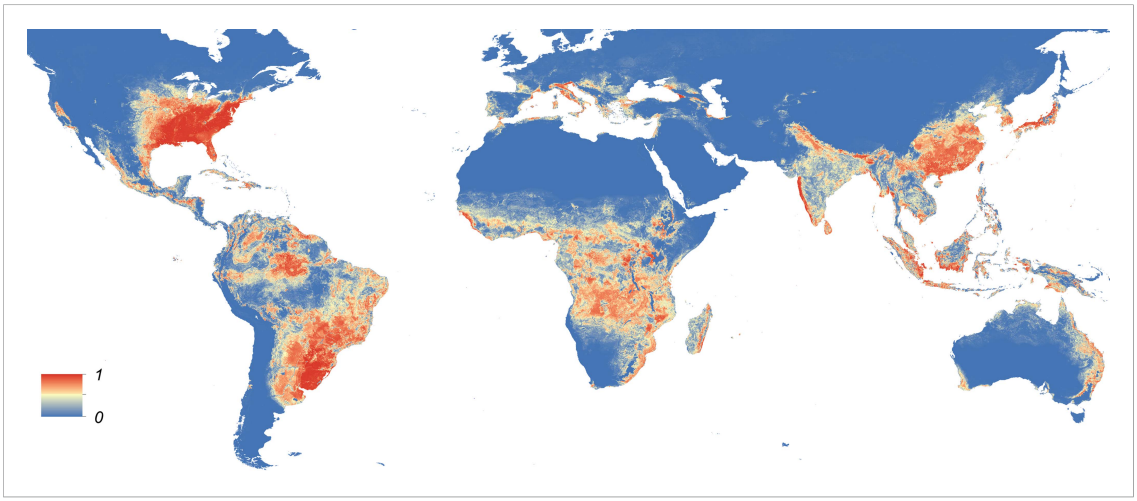


Figura 7. Distribuição global do *Ae. albopictus*. O mapa descreve a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) a 1 (vermelho) em uma resolução espacial de 5 x 5km

Fonte: Adaptado de Kraemer *et al*. (2015).

2.3 PESQUISA ENTOMOLÓGICA

Uma das formas de controle das arboviroses é o acompanhamento do seu vetor (BRASIL, 2013). A compreensão de fatores relacionados aos vetores com mapeamento de áreas de riscos em determinados territórios pode ser utilizada pela a vigilância epidemiológica como ferramenta de combate a doenças (BRAGA; VALLE, 2007). Os métodos de monitoramento dos mosquitos a fim de predizer a probabilidade de novos casos de determinada região são úteis para tomada de decisões dos agentes públicos. Não existe um método de mensuração de infestação definido como padrão. Nos programas de controle de arboviroses, os índices larvários são os mais utilizados, mas existem também aqueles que mensuram informações relativas a ovos e adultos (BRASIL, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) estimulam a realização de métodos simplificados na realização de levantamentos entoepidemiológicos. A obtenção de informações de forma rápida permite o direcionamento de ações para área críticas de forma mais oportuna com maior racionalização de recursos (BRASIL, 2013).

O Levantamento de Índice Rápido para o Aedes aegypti (LIRAa), desenvolvido em 2002, possui como principal qualidade a capacidade de apresentar de forma rápida e segura números de infestações larvárias (BRASIL, 2009; GOMES, 1998). O LIRAa é baseado na vistoria de depósitos de água e recipientes em imóveis e regiões próximas (BRAGA; VALLE, 2007). Os índices larvários identificam o nível de densidade e distribuição dos vetores nas localidades. O LIRAa possui uma boa praticidade quando comparado aos índices que utilizam as formas adultas. A sua execução é direcionada para criadouros peridomésticos avaliados de forma sistemática e planejada (GOMES, 1998).

Desde a publicação da resolução do Ministério da Saúde número 12, em janeiro de 2017, os municípios com mais de 2.000 habitantes são obrigados a realizar o LIRAa. O cálculo do LIRAa é baseado em três indicadores entomológicos: Índice de Breteau-IB, o Índice de Tipo de Recipiente-ITR, Índice de Infestação Predial-IIP (BRASIL, 2013). Os limiares de risco de transmissão de dengue propostos pelo Programa Nacional de Controle da Dengue para os indicadores obtidos mediante o LIRAa são os seguintes: <1: satisfatório, 1 a 3,9: alerta e > 3,9: risco (BRASIL, 2015).

O cálculo da amostra a ser avaliada para construção dos indicadores do LIRAa tenta atender a princípios de uma determinada precisão a um custo mínimo. A mensuração é realizada por uma amostra probabilística, excluindo pontos estratégicos. A técnica utilizada é de amostragem por conglomerados e considera a densidade populacional e o número de imóveis. O quarteirão é considerado a unidade primária e o imóvel é a unidade secundária. O município

é dividido em estratos com características socioambientais semelhantes. Cada estrato possui entre 8.100 a 12 mil imóveis, entre esses é realizada uma amostra independente de 20% dos imóveis. Caso o estrato possua entre 2.000 a 8.100 imóveis, a amostragem terá ser de 50% dos imóveis (BRASIL, 2001).

A coleta de larvas não é o método mais eficaz para medir a abundância do adulto ou para estimar o risco de transmissão. Por outro lado, a coleta de adultos é mais custosa e demorada apesar de ser mais fidedigna. Existem ainda, os métodos que instalam armadilhas de oviposição (ovitrampas) ou de larvas (larvitrampas) (BRAGA; VALLE, 2007).

Os criadouros onde se encontram as larvas estão sujeitos a diversos fatores que podem influenciar na quantidade de formas aladas produzidas como tamanho, quantidade de espécimes e espelho d'agua. Da mesma forma, a presença de ovitrampas positivas podem não prever o risco de transmissão arboviroses entre diferentes áreas considerando que pode haver números desproporcionais de criadouros nas diferentes áreas com a mesma quantidade de ovitrampas (FOCKS, 2004).

As larvitrampas (Figura 8) são utilizadas em locais específicos como portos e aeroportos, pois é recomendado que sejam utilizadas em pontos considerados como porta de entrada para o vetor adulto (BRAGA; VALLE, 2007; BRASIL, 2001). As larvitrampas possuem melhor eficiência que os métodos larvários (BRAGA; VALLE, 2007; SILVA; LIMONGI, 2018).

Figura 8. Lavitrampa

Fonte: Adaptado de Brasil (2001).

A ovitrampa é uma armadilha com as características ideais para atrair o mosquito no momento da ovipostura. É um método sensível, sendo seu uso estimulado principalmente na detecção precoce de infestações, seja no surgimento de um novo foco ou reaparecimento do mosquito em áreas na qual ele foi erradicado. Objetivamente são usados dois índices para avaliar sua produtividade: Índice de Positividade de Ovo (IPO) que indica a porcentagem de armadilhas positivas; e Índice de Densidade de Ovo (IDO) que indica o número médio de ovos por armadilha positiva (BRASIL, 2009).

Os primeiros testes com ovitrampas foram publicados por Fay em 1965. As ovitrampas possuem maior sensibilidade que os índices larvários e as lavitrampas. Tem utilidade principalmente para avaliar a dispersão do vetor. O Plano Nacional de Controle de Dengue (PNCD) considera o uso de ovitrampas para avaliar áreas de baixa densidade do mosquito e em áreas sob vigilância (BRAGA; VALLE, 2007), situação na qual os índices larvários são pouco produtivos (BRASIL, 2001; MARQUES *et al.*, 1993).

2.4 ARBOVÍRUS

Os arbovírus são formados por um conjunto de centenas de vírus transmitidos por artrópodes (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). O termo arbovírus foi utilizado pela primeira vez por pesquisadores da Califórnia na década de 1940. A denominação arbovírus não define um grupo taxonomicamente distinto. No entanto, esses vírus têm padrões de transmissão e história natural semelhantes. As informações de um vírus são potencialmente úteis para a compreensão do grupo como um todo (KUNO; CHANG, 2005).

O Catálogo de Arbovírus do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos possui 530 tipos de arbovírus identificados que por sua vez podem ser divididos em quatro gêneros: *Flavivírus*, *Alphavírus*, *Orthobunyavirus* e *Phlebovírus* (GUBLER, 2006; THANGAMANI *et al.*, 2016). A maior parte dos arbovírus pertencem aos gêneros *Alphavirus* (família *Togaviridae*) e *Flavivirus* (família *Flaviviridae*); outros membros de importância para a saúde humana são das famílias *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (FURUYA-KANAMORI *et al.*, 2016). Apesar dessa grande diversidade, quatro arbovírus causam maior impacto na saúde humana: vírus da febre amarela, DENV, CHIKV e ZIKV (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

O ciclo de transmissão basicamente envolve os vírus, hospedeiros vertebrados e artrópodes que, por sua vez, são hematófogos (GUBLER, 1998; KUNO; CHANG, 2005). Os culicideos, principalmente aqueles que pertencem aos gêneros *Culex* e *Aedes* transmitem os

vírus mais relevantes para a saúde humana. A presença do mosquito permite que o vírus circule entre os animais silvestres, tendo o homem e animais domésticos como hospedeiros acidentais. Porém alguns vírus como DENV, ZIKV e CHIKV perderam a necessidade de amplificação enzootica e ganharam a capacidade de produzir epidemias tendo apenas o homem como hospedeiro vertebrado (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). É importante enfatizar que os vertebrados nem sempre são necessários para manter o ciclo de transmissão, e pode haver formas alternativas de manter o patógeno na natureza, como a transmissão vertical (DIAZ *et al.*, 2013; LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016).

O DENV é o arbovírus mais prevalente e tem manifestações importantes em seres humanos sobrecarregando o sistema de saúde em todo o mundo (DIAZ *et al.*, 2013). Está presente em mais de 100 países tropicais e subtropicais da Ásia, África e Américas, onde as condições de temperatura e umidade favorecem a proliferação de vetores de mosquitos. No entanto, outros arbovírus como o Zika e Chikungunya têm sido um problema de saúde em muitos países onde há um verdadeiro surto triplo (ROOT *et al.*, 2006).

Para o surgimento de epidemias, as populações de vetores e hospedeiros devem se cruzar repetidamente em um ambiente propício. As recentes mudanças climáticas associadas com o surgimento de centros urbanos com grande aglomeração de pessoas de forma desorganizada facilitam o surgimento das epidemias. Ademais, pequenas alterações na genética viral podem aumentar a virulência e viremia nos vertebrados, além de melhorarem a competência vetorial (KRAEMER *et al.*, 2019).

2.4.1 Dengue

O agente etiológico da dengue é o DENV que possui quatro sorotipos antigênicos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Os sorotipos são antigenicamente diferentes, porém imunogênicamente semelhantes (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004).

O DENV é um *Flavivirus* que possui um genoma encapsulado dentro de um núcleo denso de elétrons cercado por uma bicamada lipídica, formando pequenas partículas esféricas com aproximadamente 50 nm de diâmetro. O RNA genômico é traduzido para gerar todas as proteínas virais, incluindo três proteínas estruturais (capsídeo , pré-membrana / membrana e envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3 , NS4A, NS4B e NS5) (COFFEY *et al.*, 2013).

O DENV é hiperendêmico em muitas regiões tropicais asiáticas, onde dois ou mais sorotipos circulam endemicamente e periodicamente. Embora a DENV provavelmente tenha sido introduzida nas Américas por navios à vela desde o século XVII, o surgimento da DENV hiperendêmica no Hemisfério Ocidental iniciou mais tarde, devido a uma campanha parcialmente bem-sucedida que erradicou provisoriamente o *Aedes aegypti* para controlar a febre amarela. Essa campanha teve sucesso na maioria das Américas entre os anos 50 e 70, mas foi interrompida. *Aedes aegypti* rapidamente recolonizou quase todos os neotrópicos e subtópicos, e a invasão da DENV ocorreu logo depois (WEAVER; REISEN, 2010).

A transmissão inter-humana de DENV é altamente eficiente devido aos altos títulos de viremia encontrados em muitas pessoas (DIAZ *et al.*, 2013). É estimado que o DENV cause infecção em 390 milhões de pessoas anualmente, destas 96 milhões terão sintomas clínicos (KRAEMER *et al.*, 2015). A maior parte dos sintomas são leves e autolimitados (GUZMAN; HARRIS, 2015), sendo as principais manifestações: vômitos, cefaleia, artralgia, mialgia e prurido.

A OMS categorizou os pacientes com dengue e sintomáticos em grupos que são diferenciados pela presença de sinais de alarme (dor abdominal e vômitos persistentes, sangramento de mucosas, letargia, hepatomegalia e elevação de hematócrito) e sinais de dengue grave (choque, sangramento grave, dispneia ou disfunção orgânica) (WHO, 2011). A despeito da minoria dos casos estarem na categoria de dengue grave, são estimadas cerca de dez mil mortes anuais no mundo por esta doença (STANAWAY *et al.*, 2016).

As manifestações mais graves foram descritas pela primeira vez após a Segunda Guerra Mundial, coincidentes com o aumento da urbanização, principalmente na Ásia. As formas mais dramáticas da doença estão fortemente associadas a infecções por um segundo sorotipo. A circulação de múltiplos sorotipos de forma simultânea nas populações urbanas justifica o surgimento relativamente recente dessas síndromes. A ocorrência generalizada das síndromes de hemorrágicas foi atrasada nas Américas, porque o DENV não se tornou hiperendêmico até os anos 80 e posteriores (WEAVER; REISEN, 2010).

2.4.2 Zika

O ZIKV é um *Flavivírus* que foi isolado pela primeira vez de um macaco sentinela na floresta Zika de Uganda em 1947; um ano depois, o vírus foi isolado de *Aedes africanus* no mesmo local. No entanto, até recentemente, o ZIKV não tinha sido associado a grandes surtos

de doenças, apesar da soroprevalência humana ser bastante alta em determinados países como Nigéria e Malasya (MUSSO; GUBLER, 2016).

O ZIKV é envolvido por uma partícula de 50 nm, contém um nucleocápsideo interno composto por um RNA genômico linear de fita positiva e várias cópias da proteína do capsídeo viral e da bicamada lipídica derivada da célula hospedeira externa com 180 cópias de cada uma das duas proteínas: a proteína da membrana viral (M, um produto de clivagem de prM) e a proteína do envelope (E) (MUSSO; GUBLER, 2016).

O primeiro relato de doença em humanos causada pelo ZIKV foi em 1954 em um surto de icterícia na Nigéria. Entre 2013 e 2014, houve uma grande epidemia na Polinésia Francesa com suspeita de acometimento de cerca de 11% da população e relato de complicações neurológicas graves como a síndrome Guillain-Barré. No início de 2015 foi documentado transmissão autóctone de ZIKV no Brasil e o relato de casos de microcefalia. Ao todo no ano de 2016 foram notificados quase 180.000 casos de ZIKV nas Américas. O ZIKV circula por todos os continentes e é endêmico nas Américas (MUSSO; GUBLER, 2016; WEAVER; REISEN, 2010).

O ZIKV possui um período de incubação de 4 a 10 dias, sendo que a maior parte das infecções são assintomáticas. O quadro clínico é semelhante a outras arboviroses e produz sintomas gripais associados a febre alta, mal-estar, tontura, anorexia, dor retrorbitaria, conjuntivite, edema, linfadenopatia e manifestações articulares. Existe relato de hematoespermia e trombocitopenia em humanos. Um crescente número de evidências sugere que, em alguns casos graves, o ZIKV causa doenças neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré em adultos e microcefalia em bebês nascidos de mulheres infectadas pelo ZIKV. Às vezes, também é relatada uma erupção cutânea. Assim, o diagnóstico requer sorologia ou isolamento de vírus (SONG *et al.*, 2017; WEAVER; REISEN, 2010).

O ZIKV possui dois ciclos distintos de transmissão: silvestre e urbano. O ciclo silvestre envolve a manutenção do vírus entre primatas não humanos e mosquitos. O ciclo urbano envolve humanos e os mosquitos. Pode ocorrer intercâmbio entre os dois ciclos quando o mosquito transmite o vírus de primatas não humanos para humanos (MUSSO; GUBLER, 2016). O ciclo urbano é mantido por dois vetores que são o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A transmissão do vírus também pode ser humano-humano na forma perinatal, sexual e através a amamentação (SONG *et al.*, 2017).

2.4.3 Chikungunya

Os *Alfavírus* compreendem um grupo 29 espécies distribuídas quase globalmente e incluem três categorias principais: vírus aquáticos, vírus artralgicos e vírus encefalíticos. Quase todos os *Alfavírus* são transmitidos por mosquitos. Entre os *Alfavírus* artralgicos, o CHIKV é o de maior importância para os humanos (COFFEY *et al.*, 2013).

Os *Alfavírus* têm 70 nm de diâmetro, com nucleocápsideos e invólucros externos envolvidos que se agrupam em estruturas icosaédricas com simetria T-4. Possuem um genoma de RNA de cadeia simples de aproximadamente 12 kb. Como em todos os vírus, contém vários genomas de RNA não segmentado de sentido único, de cadeia simples, de aproximadamente 11,8 kilobase de comprimento. O genoma codifica quatro proteínas não estruturais que são responsáveis para a replicação citoplasmática do genoma viral e cinco proteínas estruturais. Um RNA subgenômico codifica três proteínas estruturais principais (capsídeo, E2 e E1). Um total de 240 cópias dos heterodímeros E2-E1 formam a camada externa do alfavírus (COFFEY *et al.*, 2013; VAIRO *et al.*, 2019) .

CHIKV historicamente foi encontrado apenas no Velho Mundo. Isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1953, durante um surto de doença febril humana acompanhada de artralgia e erupção cutânea graves. Atualmente, circula em ciclos enzoóticos por grande parte da África. Ocasionalmente, surtos de doenças humanas são detectados na África quando são implementados diagnósticos laboratoriais adequados, mas os casos frequentemente são confundidos clinicamente com DENV ou mesmo com malária. A relevância do CHIKV pode ter sido subestimada devido à dificuldade de diagnóstico diferencial com o DENV (PANIZ-MONDOLFI *et al.*, 2016). Registros históricos também indicam que o CHIKV, como o DENV, provavelmente foi transportado em navios à Ásia e, possivelmente, nas Américas por séculos, junto com *Aedes aegypti*, onde causou epidemias nas cidades portuárias, mas não conseguiu se estabelecer (WEAVER; REISEN, 2010).

Apesar de não oferecer risco de vida na maioria das vezes, o CHIKV tem sido considerado um patógeno altamente debilitante. Os pacientes geralmente cursam com febre, dor de cabeça, náusea, vômito, mialgia, erupção cutânea e artralgia grave (HOSSAIN *et al.*, 2018; THIBERVILLE *et al.*, 2013). A artralgia grave que acompanha a maioria das infecções por CHIKV é altamente debilitante e normalmente dura várias semanas, podendo perdurar por anos, resultando em um alto custo econômico, além do sofrimento humano (VAIRO *et al.*, 2019; WEAVER; REISEN, 2010).

O CHIKV tem demonstrado outras semelhanças com o DENV, como a capacidade de usar seres humanos como os únicos hospedeiros de reservas amplificação; a preferências pelos mesmos vetores; o uso de pessoas infectadas para dispersão para novas regiões adequadas para

transmissão endêmica e epidêmica; mudanças genéticas que aumentaram sua capacidade de infectar vetores de mosquitos (WEAVER; REISEN, 2010).

2.5 COMPETÊNCIA VETORIAL E CAPACIDADE VETORIAL

Apesar da semelhança, os termos capacidade vetoriais e competência vetorial possuem conotação diferente. Competência vetorial refere-se à habilidade intrínseca ao mosquito de se tornar vetor de determinado patógeno, pode ser entendida como a capacidade de um mosquito adquirir um patógeno e realizar sua transmissão (BEERNTSEN; JAMES; CHRISTENSEN, 2000; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). Por outro lado, a capacidade vetorial compreende interação entre fatores mais amplos como condições ambientais, propriedades bioquímicas e celulares que influenciam na interação entre o vetor, patógeno e hospedeiro vertebrado. Desta forma, a competência vetorial descreve a capacidade de um determinado artrópode transmitir um patógeno específico e a capacidade vetorial refere-se a taxa reprodutiva básica de um patógeno transmitido por vetor por uma determinada espécie / população vetorial. Portanto, a competência vetorial é um dos componentes da capacidade vetorial (BEERNTSEN; JAMES; CHRISTENSEN, 2000; RÜCKERT; EBEL, 2018).

Fatores genéticos e não genéticos compõe a competência vetorial. Pode haver diferenças entre espécies de mosquitos, populações de determinada região e até mosquitos individuais (RÜCKERT; EBEL, 2018). Gonçalves *et al.* (2014) demonstraram grande variação de competência vetorial para transmissão de dengue em nove populações de mosquitos coletados em Belo Horizonte.

Deve-se ressaltar que a competência vetorial é uma variável quantitativa, não qualitativa. O vírus é uma fator importante na determinação da competência vetorial, pois mutações podem determinar mudanças na interação com o hospedeiro (RÜCKERT; EBEL, 2018).

Para ocorrer o ciclo de transmissão, é necessário que o mosquito se torne capaz de transmitir o patógeno após um repasto infectado. Este processo é essencial para determinar a disseminação do patógeno. O intervalo de tempo que compreende a superação das barreiras inerentes ao vetor é definido como período de incubação extrínseco (PIE) (BLACK IV *et al.*, 2002).

São descritas barreiras necessárias para o vírus ser efetivamente transmitido pelo vetor: barreira de infecção do intestino médio, barreira de escape do intestino médio, barreira de

escape das glândulas salivares. Vários fatores podem influenciar de forma significativa nos diferentes passos desse processo (BLACK IV *et al.*, 2002).

Após ingestão e alcançar o intestino médio o patógeno se liga a receptores específicos, invadindo as células epiteliais e se replicam nesse ambiente. Ao ultrapassar a primeira barreira intestinal, o vírus pode infectar outros órgãos como os ovários e as glândulas salivares. Quando a infecção das glândulas salivares é estabelecida, o mosquito se habilita a transmitir o vírus para um hospedeiro vertebrado.

A composição bioquímica da saliva do mosquito é formada também por anticoagulantes, que por sua vez, podem agir na formação de coágulos no intestino médio. A coagulação do sangue pode inibir a migração de patógenos. No ambiente intestinal, os vírus sofrem ação de enzimas proteolíticas que podem ter impacto positivo ou negativo na sobrevivência do parasita (BLACK IV *et al.*, 2002). O intestino médio é o primeiro tecido no qual ocorrem interações entre vírus e células do mosquito que podem moldar o resultado da infecção. Os mosquitos nos quais o vírus não pode estabelecer uma infecção nesta região têm uma barreira de infecção do intestino médio. Isso pode ocorrer devido à fatores genéticos, como falta de expressão de receptores na superfície celular ou determinantes não genéticos, como densidade e composição do microbioma (RÜCKERT; EBEL, 2018). Estudos com antibióticos aumentaram a competência vetorial do *Aedes* ao DENV, bem como a reintrodução oral de espécies bacterianas específicas no intestino do mosquito adulto resulta em carga viral diminuída no vetor(SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

Após estabelecer infecção no intestino, o vírus deve atravessar a lâmina basal ao redor do epitélio do intestino para se disseminar para os outros tecidos do mosquito. Quando a replicação do vírus é limitada ao intestino médio e a disseminação não ocorre, diz-se que os mosquitos têm uma forte barreira de escape do intestino médio. A lâmina basal do intestino médio é uma barreira física para o vírus, e a espessura da lâmina basal foi previamente associada à diminuição da disseminação do DENV-1 em diferentes populações de *Aedes albopictus* (RÜCKERT; EBEL, 2018).

Após infecção do intestino médio, os vírus se disseminam para outros tecidos como as células sanguíneas, tecido nervoso, tecido muscular e as glândulas salivares. Nestas ocorrem as duas próximas barreiras: a barreira anatômica, quando o vírus se replica e é depositado nas cavidades apicais das células acinares e barreira de escape, que é a capacidade do mosquito de expelir o vírus (RÜCKERT; EBEL, 2018).

Os tecidos nos quais o patógeno irá se replicar possuem composição variada, a depender do mosquito, podem fornecer um ambiente pouco favorável para expressão do genoma viral ou

até para modificações pós traducionais de produtos gênicos necessários para o desenvolvimento. Em algum momento os patógenos devem ser transportados pelo sistema linfático, onde residem os principais componente imunes. Os mecanismos usados pelo sistema imunológico do mosquito para repelir os parasitas, bem como as estratégias usadas pelos parasitas para evadir das respostas imunes são fundamentais no processo de competência vetorial. A composição genética de uma espécie determina em grande parte a viabilização de uma relação parasita-mosquito específica (BLACK IV *et al.*, 2002; RÜCKERT; EBEL, 2018).

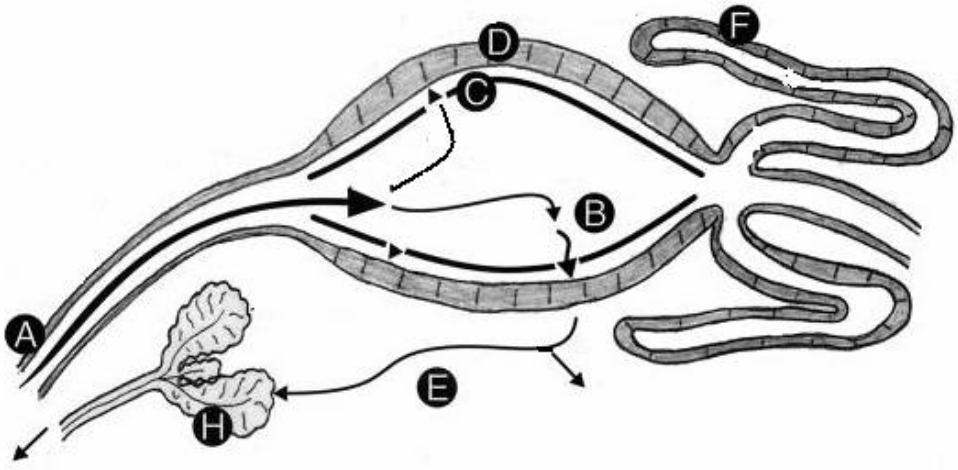


Figura 9. Trajeto (representado por linhas) e locais de desenvolvimento do vírus (representado por letras) no mosquito. Após a ingestão de uma refeição de sangue (A), todos os vírus entram no intestino médio (B). Os vírus (representados por -) entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se replicam, saem das células e viajam através do hemolinfa (E) para as glândulas salivares (H), onde se replicam para posteriormente serem injetados. (C) Matriz peritrófica; (F) Túbulos de Malpihgi

Fonte: Adaptado de Beerntsen, James e Christensen (2000).

Recentemente chegou-se à conclusão que a observação mais óbvia e bem aceita sobre competência vetorial em *Aedes aegypti* é que existe uma grande variabilidade na suscetibilidade a infecções por arbovírus entre populações geográficas e até na mesma população com diferentes espécies e cepas virais. A grande variação entre as populações geográficas de mosquitos é provavelmente devido ao fato de que a competência do vetor ser um fenótipo complexo e em evolução, dependente da interação entre o hospedeiro, o patógeno e os simbiontes do hospedeiro (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

A mesma revisão de literatura chega a outras quatro conclusões interessantes: 1) Casos de refrataridade completa a infecção por arbovírus são raros entre os *Aedes agypti*; 2) Existe susceptibilidade completa para o DEVN, ZIKV e CHIKV em alguns casos; 3) A intensidade inicial da infecção correlaciona-se com a taxa de infecção; 4) As populações brasileiras de *Aedes aegypti* são particularmente susceptíveis ao DENV-2; 5) A adaptação do vírus a diferentes tipos de mosquitos parece ser uma importante força evolutiva, particularmente para o CHIKV; 6) Dados sobre co-infecção ainda são limitados, porém mostram que infecção por um vírus afeta a competência vetorial de um segundo patógeno (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

A capacidade vetorial descreve a taxa reprodutiva básica de um patógeno transmitido por vetor e pode ser resumida pela fórmula (Figura 10) que ilustra como os principais fatores de influência se interagem (RÜCKERT; EBEL, 2018).

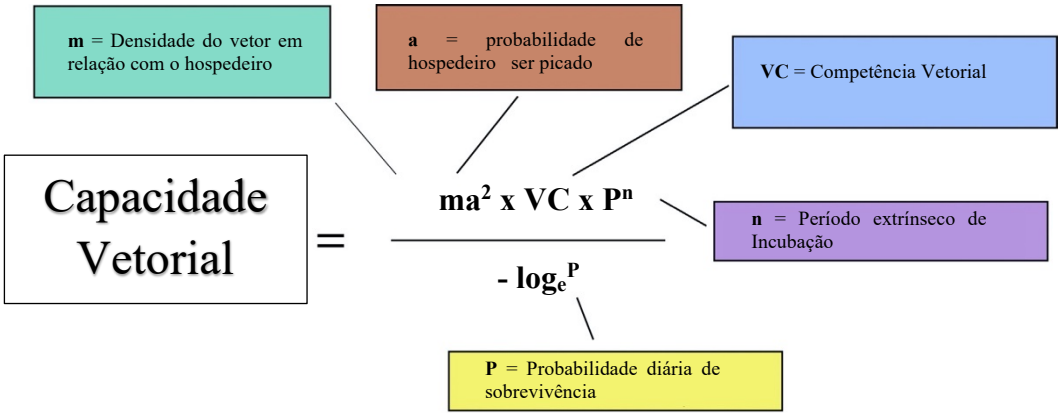


Figura 10. Fórmula da capacidade vetorial descreve o número total de picadas infecciosas futuras decorrentes de mosquitos que picam um hospedeiro infeccioso individual em um único dia. Consiste em cinco fatores: densidade do vetor em relação ao hospedeiro (m), probabilidade diária do hospedeiro sendo alimentado (a), competência do vetor da população de mosquitos (CV), probabilidade de sobrevivência diária (P) e extrínseco período de incubação (n)
Fonte: Adaptado de Rückert e Ebel (2018).

O PEI e a probabilidade de sobrevivência diária são as variáveis mais influentes na capacidade vetorial. Caso a probabilidade de sobrevivência diária do mosquito seja baixa e a PEI longa, a probabilidade de transmissão é baixa. O PEI é afetado por condições ambientais, como temperatura e fatores genéticos que influenciam a competência do vetor da população de mosquitos. Os vírus podem se adaptar a uma disseminação mais rápida em espécies de mosquitos suscetíveis e, assim, encurtar o PEI (RÜCKERT; EBEL, 2018). A transmissão viral foi avaliada através da inoculação de extratos corporais de mosquitos ou de saliva em culturas

de tecido e foi evidenciado períodos de incubação mais curtos para CHIKV denotando uma transmissão mais rápida que para os DENVs (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

O *Aedes aegypti* possui hábitos intradomicialiares, o que viabiliza oportunidade de se alimentar mais vezes durante o dia. Desta forma, possui uma capacidade vetorial melhor que o *Aedes Albopictus* que possui hábitos peridomiciliares. É importante ressaltar que a quantidade de repastos realizados por dia aumenta exponencialmente a capacidade vetorial. Como já foi discutido anteriormente, a densidade populacional é um fator relevante para a capacidade vetorial (RÜCKERT; EBEL, 2018).

2.6 COINFECÇÃO E COTRANSMISSÃO DE ARBOVIROSES

Cidades com crescimento desordenado e aglomeração populacional são propícias para o desenvolvimento do *Aedes aegypti* e permitem uma maior circulação de arbovírus como DENV, CHIKV e ZIKV. Desta forma, o mosquito pode ser coinfectado por dois ou vários arbovírus (VOGELS *et al.*, 2019). Estudos recentes têm sido realizados para avaliar como a coinfecção pode mudar a epidemiologia e a evolução dessas arboviroses (CARRILLO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*, 2018; PANIZ-MONDOLFI *et al.*, 2016; RÜCKERT *et al.*, 2017; VOGELS *et al.*, 2019).

A infecção múltipla pode ocorrer de forma simultânea ou sequencial. Quando o vetor se alimenta de um hospedeiro com mais de um vírus pode haver coinfecção de forma simultânea. Da mesma forma, o mosquito infectado por dois ou mais patógenos pode transmitir simultaneamente múltiplos vírus para um hospedeiro vertebrado (VOGELS *et al.*, 2019). Quando o vetor se alimenta de um indivíduo com um vírus e sequencialmente realiza o repasto em outro hospedeiro infectado com um arbovírus diferente, pode haver contaminação sequencial do vetor. Por outro lado, pode haver coinfecção sequencial do hospedeiro caso dois mosquitos com patógenos diferentes transmitam os patógenos em momentos distintos (Figura 11) (GÜNTHER *et al.*, 2007).

Carrillo-Hernández *et al.* (2018) estudaram coinfecção e cocirculação de DENV, ZIKV e CHIKV em humanos na fronteira entre a Colômbia e Venezuela. Foram colhidas 157 amostras de sangue de pacientes com síndrome febril e avaliada a infecção por PCR. Sessenta e nove por cento da população encontrava-se acometida por algum dos três vírus: 21.02% para DENV, 29.94% para CHIKV, e 18.47% para ZIKV. A prevalência de coinfecção com DENV/CHIKV, DENV/ZIKV e CHIKV/ ZIKV foi de 7,64%, 6,7% e 5,1%, respectivamente. Cerca de 2% da população estudada encontrava-se infectada pelos três vírus.

A cotransmissão de DENVe ZIKV foi avaliada experimentalmente em mosquitos *Aedes aegypti* oriundos de ovos coletados na cidade de Manaus. Seiscentos mosquitos da terceira geração foram separados em três grupos de 200 *Aedes Aepyti*. Um grupo foi infectado com ZIKV, outro grupo por DENV e o terceiro foi infectado pelos dois vírus. Os mosquitos foram infectados por sangue contendo os vírus por um sistema artificial de alimentação artificial através de uma membrana. Quatorze dias após a infecção a capacidade de transmissão de 80 mosquitos coinfectados foi testada através da biópsia da orelha de ratos, local de repasto destes mosquitos. A transmissão ocorreu de forma preferencial com ZIKV em detrimento do DENV na amostra estudada com co-infecção (CHAVES *et al.*, 2018).

Cotransmissão de DENV, CHIKV e ZIKV foi avaliada em laboratório utilizando uma colônia mexicana de *Aedes aegypti*. Os mosquitos foram expostos a cepas de vírus de DENV, ZIKV, CHIKV oriundos de diversos países americanos (México, Porto Rico e EUA). A exposição aos três tipos de vírus foi provocada de forma individual e concomitante por meio de cultura de sangue. A porcentagem geral de mosquitos que foram infectados quando expostos a um único vírus foi a mesma quando expostos de forma concomitante ao CHIKV / DENV-2 e DENV-2 / ZIKV. Após a co-exposição ao ZIKV / CHIKV, houve uma pequena redução da taxa de infecção de ZIKV quando comparada à exposição única. As taxas de transmissão foram avaliadas mensurando as cópias virais na saliva dos mosquitos. Estas taxas não foram significativamente afetadas pela coinfecção em nenhuma das combinações testadas, com exceção do CHIKV/DENV-2, em que foi a taxa de transmissão de CHIKV foi reduzida em 27%. Neste estudo, a cotransmissão dos três vírus foi documentada e ficou comprovado que vários arbovírus podem ser transmitidos por um único mosquito durante um único episódio de alimentação (RÜCKERT *et al.*, 2017).

A coinfecção e cotransmissão estão bem documentadas e podem ter um papel fundamental na manutenção dos DENV, ZIKV e CHIKV no Brasil (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). No entanto, não se sabe qual o grau de interação entre os três vírus ou até se a coinfecção pode alterar o curso clínico do indivíduo acometido (VOGELS *et al.*, 2019).

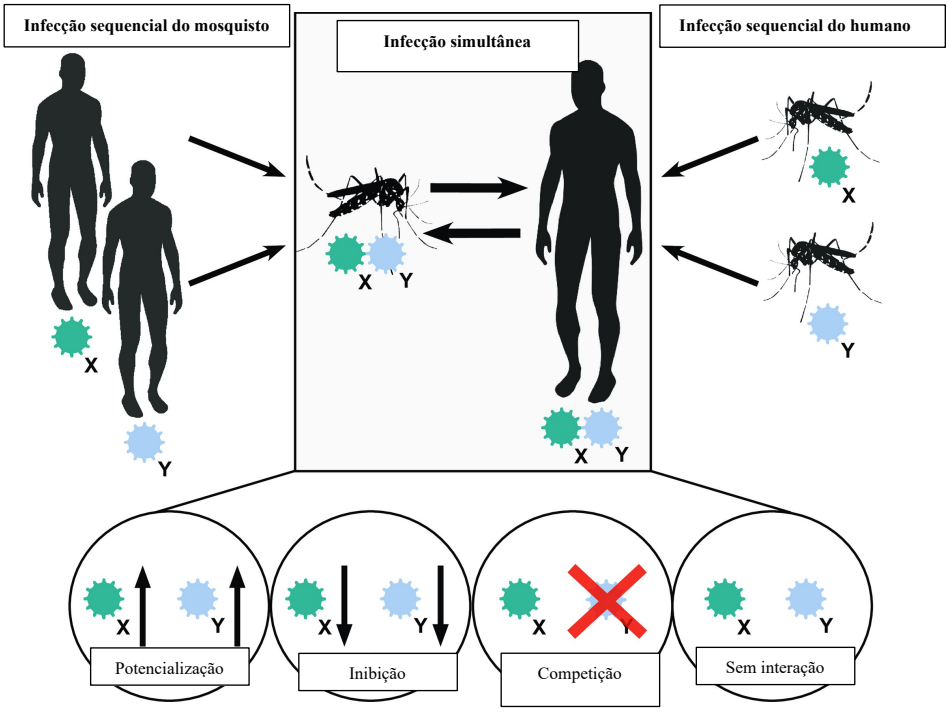


Figura 11. A coinfecção pode ser resultado da transmissão simultânea de vários vírus entre mosquitos e humanos ou transmissão sequencial durante várias picadas de mosquito. Quatro cenários podem explicar as consequências da coinfecção por vírus dentro de vetores de mosquitos e hospedeiros humanos: potencialização, inibição, competição ou neutro.

2.7 TRANSMISSÃO VERTICAL

Os arbovírus são transmitidos principalmente por transmissão horizontal por meio de mosquitos fêmeas infectados (DIAZ *et al.*, 2013). Desta forma, o mosquito é infectado quando ingere sangue de um hospedeiro virêmico. Após o PIE, o inseto é capaz de transmitir o vírus para um novo hospedeiro vertebrado (WU *et al.*, 2019). Esse tipo de transmissão pode ocorrer ao longo do ano, em surtos esporádicos com intervalo de anos em um padrão sazonal cíclico (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

No entanto, em muitas regiões, as condições ambientais não favorecem a transmissão horizontal durante todos os meses do ano, seja por temperaturas mais baixas ou por baixa umidade. Condições climáticas adversas reduzem a densidade populacional dos mosquitos (KRAEMER *et al.*, 2015; RYAN *et al.*, 2018). Além disso, a comunidade de hospedeiros vertebrados pode ter uma imunidade estabelecida que não permita a transmissão sustentada do hospedeiro. Nestas condições para perpetuação da espécie é necessário um mecanismo de

transmissão alternativo, espécies de hospedeiro de reservatório ou reintrodução do vírus (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

Uma forma de persistência dos arbovírus durante períodos desfavoráveis é a ocorrência de transmissão vertical no vetor artrópode que consiste na transferência de arbovírus da mãe infectada para sua prole (KUNO; CHANG, 2005). A transmissão vertical em mosquitos geralmente é materna e ocorre por meio de dois mecanismos principais: transmissão transovariana (TOT), em que o vírus infecta os tecidos germinativos das fêmeas e transmissão trans-ovo, em que o vírus infecta o ovo durante a oviposição (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016). A coleta de amostras de ovos de *Aedes sp*. no ambiente é uma importante ferramenta de monitoramento para as populações vetoriais e virais, com detecção precoce da circulação do vírus, o que pode contribuir para medidas de controle mais efetivas (DELATTE *et al.*, 2010; GUBLER, 1998; HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2009).

A transmissão vertical de DENV, CHIKV e ZIKV foi documentada por vários estudos, evidenciando outros mecanismos de manutenção viral na natureza, independentemente de surtos virais (DELATTE *et al.*, 2010; GUBLER, 1998; HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2009). No entanto, a importância epidemiológica chega a ser discutida pela raridade deste tipo de transmissão em estudos realizados em ambiente laboratorial. A controvérsia decorre principalmente das taxas baixas de transmissão vertical para justificar a manutenção a longo prazo dos arbovírus (KUNO; CHANG, 2005). Além disso, existem discrepâncias entre observações de campo e estudos de laboratório, bem como inconsistências entre técnicas virológicas (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016). Vários fatores, incluindo os métodos de ensaio viral, espécies de mosquitos e meio de cultura podem ter contribuído para resultados conflitantes (AGARWAL *et al.*, 2014). De qualquer forma, a sensibilidade dos estudos melhoraram após a evolução das técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase – tempo real (RT- PCR) (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016).

O método laboratorial utilizado para infectar as progenitoras influencia significativamente a taxa de transmissão vertical. Mães inoculadas intratorácicamente e infectadas verticalmente resultaram em taxas mais altas de sucesso em comparação às mães infectadas por via oral (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016). As inoculações intratorácicas, que ignoram a rota natural de infecção através do intestino, resultaram em maiores taxas de transmissão do que as infecções orais. Provavelmente, isso ocorre porque as mães inoculadas com a via intratorácica desenvolvem mais rapidamente uma infecção viral sistêmica e atingem títulos virais mais altos do que as fêmeas infectadas por via oral (SMITH *et al.*, 2007). Mães infectadas verticalmente também apresentaram maior taxa de transmissão,

o que poderia ser consequência de uma infecção estabilizada da linha germinativa (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016). A prole produzida durante o segundo ou posteriores ciclos gonadotróficos apresentaram taxas de transmissão mais altas do que os filhotes produzidos durante o primeiro ciclo gonotrófico (AGARWAL *et al.*, 2014; HONÓRIO *et al.*, 2019). Assim, curiosamente, a transmissão vertical na natureza poderia alcançar melhores taxas de transmissão.

Phumee *et al.* (2019) tiveram sucesso em comprovar a transmissão vertical para o ZIKV em laboratório na primeira prole de *Aedes aegipty*. Não foram obtidos os mesmos resultados para *Aedes albopictus*, demonstrando maior capacidade do *Aedes aegypti* de manter circulação viral em períodos interepidêmicos. A transmissão vertical foi investigada por Ciota *et al.* (2017) em colônias de laboratório de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para o ZIKV de diferentes cidades por meio de sangue infectado. Como resultado, constatou-se que mosquitos de lugares diferentes tinham taxas de transmissão diferentes.

Chaves *et al.* (2019) estudaram transmissão vertical em *Aedes aegypti* coletados na cidade de Manaus. Os mosquitos foram infectados por via oral e a primeira oviposição foi comparada com um grupo controle. Ficou comprovada a transmissão vertical do ZIKV. No entanto, observou-se menor número de cópias virais de cDNA na prole infectada. Interessantemente, os ovos infectados tiveram eclosão mais lenta e menor taxa de eclosão quando comparados com o grupo controle.

Os DENV1-4 foram os vírus mais representados nos estudos de transmissão vertical, o que permitiu análises mais aprofundadas dos dois principais vetores de DENV do mundo, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Taxas significativamente mais altas de transmissão vertical foram observadas em *Aedes albopictus* comparado *Aedes aegypti*. DENV2, DENV3 e DENV4 apresentaram taxas de transmissão significativamente mais baixas que o DENV1. Embora não exista uma explicação óbvia para esse fenômeno, a contabilização de um recurso específico desse sorotipo poderia melhorar os modelos epidemiológicos da dengue. Essa variação genética poderia alimentar a evolução adaptativa da transmissão vertical em um cenário em que os vetores se movem para áreas mais hostis sazonalmente (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016).

Algum grau de heterogeneidade também foi descrito ao comparar a transmissão *Aedes Alpobictus* para CHIKV de diferentes partes do mundo (HONÓRIO *et al.*, 2019). A transmissão vertical de CHIKV em laboratório tem sido relatada em diferentes publicações com sucesso para comprovar esse fenômeno (AGARWAL *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2007).

Apesar de muitos trabalhos avaliarem a transmissão vertical e diferentes estudos de cotransmissão, poucas publicações avaliaram a cotransmissão de arbovírus por transmissão vertical.

3 JUSTIFICATIVA

A Tabela 1 demonstra o número de casos confirmados através de notificação compulsória de Dengue, Zika e Chikungunya desde 2017 em Vitória da Conquista, segundo dados fornecidos pela Secretaria Municipal de Saúde do município. O número de casos confirmados de Dengue vem aumentando rapidamente desde 2017. O número de casos confirmados de Chikungunya evoluiu com uma elevação acintosa em 2018, com uma queda expressiva em 2019. Com relação a Zika, houve apenas 1 caso em 2017, não houve casos em 2018 e, finalmente, ocorreu o aparecimento de 8 casos em 2019. Os primeiros 5 meses do ano de 2020 já apresentam uma grande elevação do número de casos de Dengue, elevação do número de casos de Chikungunya e, proporcionalmente, uma redução do número casos confirmados de Zika. Fatores como dificuldade de diagnóstico laboratorial e subnotificação de casos podem estar influenciando estes dados. A variabilidade do número de casos confirmados torna necessário um monitoramento rigoroso das arboviroses, considerando o impacto que estas doenças possuem para sistema de saúde.

	Dengue	**Chikungunya**	**Zika**
2016	1562	2	1
2017	5	3	1
2018	1	50	0
2019	122	4	8
2020 (jan-maio)	405	5	3

Tabela 1. Número anual de casos confirmados por arbovirose

Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Vitória da Conquista (2020).

A principal ferramenta de monitoramento das arboviroses nos municípios brasileiros é o LIRAa. Esse tem-se mostrado muito útil pelo baixo custo e praticidade. No entanto, fazer relações diretas sobre os índices larvários e os níveis de transmissão pode ser pouco acurado (FOCKS, 2004; GOMES, 1998). Apesar de recomendado por eminentes autoridades sanitárias (OPAS, OMS, Ministério da Saúde), o LIRAa pode não ter relação com a circulação viral. O monitoramento através de ovitrampa pode fornecer informações epidemiológicas complementares e relevantes, pois possui melhor sensibilidade e detecta a circulação dos vírus em regiões com baixa densidade vetorial (BRAGA; VALLE, 2007). O estudo tem como um dos objetivos avaliar a correlação entre o escore de LIRAa e a circulação viral com o intuito de fornecer maior confiabilidade para o escore de LIRAa nas condições do município.

É essencial monitorar as formas de transmissão e manutenção dessas doenças para desenhar estratégias de intervenção. Devido à grande variabilidade de fatores que podem interferir na interação vetor, hospedeiro e vírus, é indispensável o estudo dessas relações em um contexto local. A compreensão da transmissão vertical pode trazer dados de como os patógenos se perpetuam durante períodos de baixa temperatura e baixo índice pluviométrico, condição ambiental comum entre os meses de março a setembro na região. Além disso, o estudo da transmissão vertical em uma área endêmica para DENV, ZIKV e CHIKV pode ajudar na compreensão acerca da circulação dos vírus em diferentes regiões.

Desta forma, o estudo da circulação de DENV, CHIKV e ZIKV em um contexto local por meio de ferramentas de monitoramento reconhecidamente mais eficientes que o LIRAa como ovitrampas (BRAGA; VALLE, 2007; SILVA; LIMONGI, 2018) pode trazer dados relevantes para o entendimento do comportamento do número de casos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O estudo tem como objetivo avaliar a circulação de ZIKV, CHIKV e DENV em larvas oriundas de ovos coletados em diferentes bairros de Vitória da Conquista

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Documentar a circulação do DENV, ZIKV e CHIKV em 5 diferentes regiões (Norte, Leste, Oeste, Sul e Centro) de Vitória da Conquista
2. Avaliar a relação entre os níveis de LIRAa, a presença de transmissão vertical e a circulação dos diferentes vírus
3. Avaliar a presença de cotransmissão vertical através da avaliação de larvas individuais

5 METODOLOGIA

5.1 ÁREA DO ESTUDO

A pesquisa foi desenvolvida no município de Vitória da Conquista, terceira maior cidade do estado, localizada na mesorregião do Centro-sul e a 509 km da capital do estado, imersa na região econômica do sudoeste, com uma altitude de 923 m acima do nível do mar. Apresenta uma área de 3.704,018 km² (IBGE, 2015), com população estimada de 306.866 habitantes e 91,41 hab/km² em consonância com censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2010 (IBGE, 2010).

Em Vitória da Conquista há a presença da bacia hidrográfica do Rio Pardo e Bacia do Rio de Contas. O clima é tropical subúmido a seco. Apresenta grandes variações climáticas devido a sua altitude, com a temperatura anual média de 20 graus Célsius. As "chuvas de neblina", como são chamadas, concentram-se no período de abril a agosto. Já as "chuvas das águas" (mais intensas e fortes) ficam concentradas no período de outubro a março (PMVC, 2013).

A área do município foi dividida em estratos, em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde, com o objetivo de sistematizar o estudo, sendo essas divisões realizadas de maneira setorizada. Dessa maneira, foi possível colher amostras dos ovos dos vetores em toda cidade de Vitória da Conquista. As armadilhas foram colocadas em pontos estratégicos da cidade, em pontos de alta, média e baixa infestação, além disso, os agentes de endemias, instalaram as armadilhas em alguns pontos chaves de infestação que são locais onde existem serviços públicos que abarcam toda a população, como cemitérios, praças, entre outros.

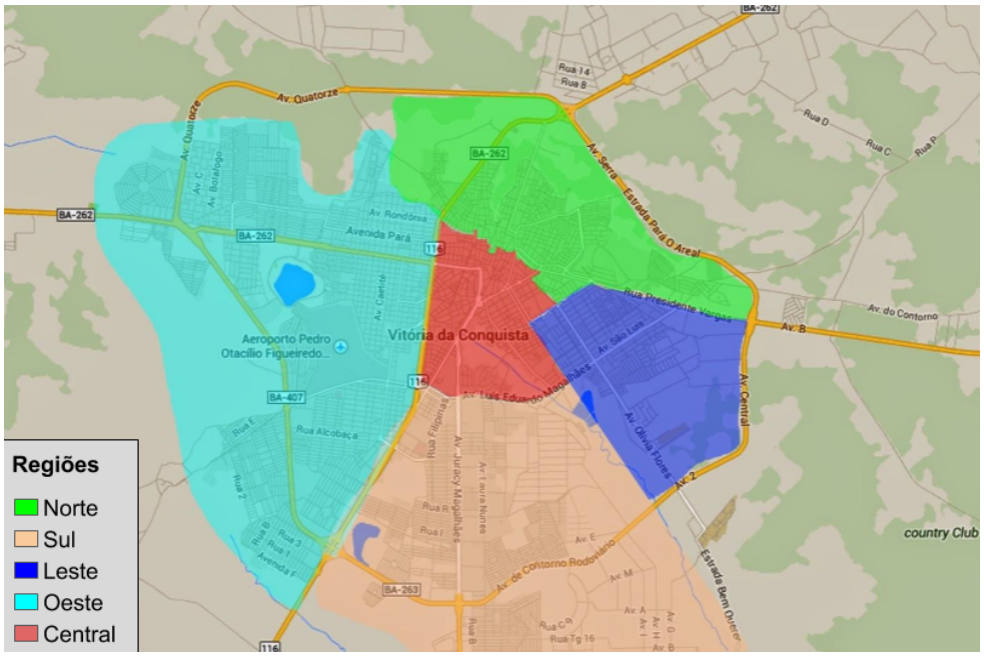


Figura 12. 5 Regiões administrativas

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Armadilha para coleta de ovos

Para coletar os ovos dos *Aedes sp*., as armadilhas foram confeccionadas com um vaso de polietileno da cor preta com 7,5 cm de altura, 10,7 cm de diâmetro e com capacidade de 430 ml, e com palhetas de madeirite do tipo Eucatex 15 cm de altura e 3 cm de largura. As armadilhas foram montadas e identificadas de acordo sua localização na cidade e posicionadas em locais estratégicos nos estratos como: Praças movimentadas, cemitérios, locais com grande movimentação de carros e pessoas, além das casas de alguns moradores. Os ovos dos mosquitos foram acondicionados em palhetas identificadas e conduzidas até o Campus Anísio Teixeira (UFBA), local no qual os ovos são eclodidos em larvas.

Figura 13. Armadilha para coleta dos ovos

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

5.2.2 Coleta dos ovos e eclosão

As palhetas contendo os ovos ficaram 7 dias em processo de secagem e, então, foram colocados em água declorada em recipiente específico para a eclosão em larvas. Os ovos foram eclodidos em um insetário a uma temperatura de 28 ° C e umidade relativa de 80%.

A água usada para eclosão passou por um rigoroso controle de qualidade, inclusive de contaminates virais, com intuito de garantir a não contaminação acidental das larvas. As larvas foram alimentadas com ração de peixe até os estágios larvais L2 ou L3, quando foram removidas do recipiente e acondicionados em freezer a -20°C até realização da extração do RNA.

As larvas foram catalogadas de acordo com os distritos administrativos e divididas em 30 pools de 15 amostras. Cada conjunto foi analisado quanto à presença dos arbovírus alvo, como descrito abaixo. Além disso, 30 larvas das regiões Norte e Oeste foram separadas imediatamente após a eclosão de cerca de 450 ovos. Cada larva foi acondicionada em um pequeno recipiente separado. A análise individual foi realizada para determinar as taxas de transmissão vertical comparativa de cada arbovírus em circulação, inclusive em possíveis larvas co-infectadas.

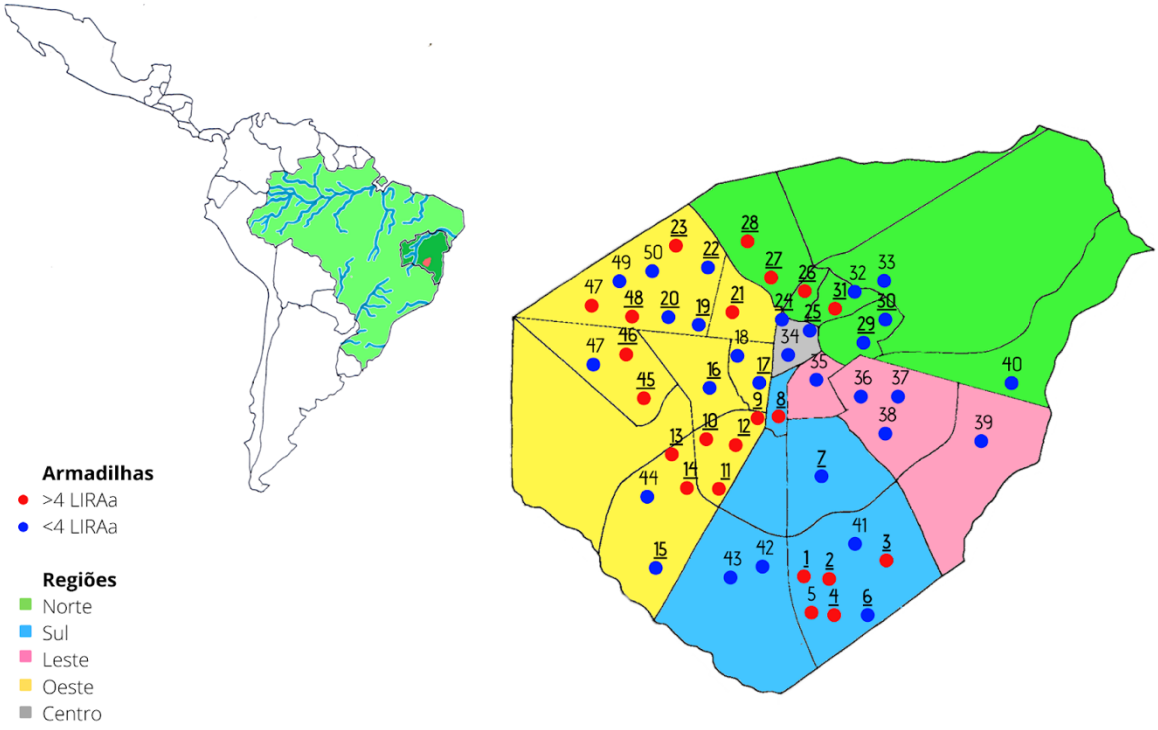


Figura 14. Distribuição das ovitrampas entre as cinco regiões administrativas conforme positividade de LIRAa

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

5.2.3 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral total de cada larva ou de cada pool foi realizado utilizando o kit comercial PureLink® Viral RNA/DNA mini kit (Invitrogen, EUA), de acordo as orientações do fabricante. Cada larva foi macerada separadamente com o auxílio do homogeneizador Tissue Ruptor (Qiagen, EUA) em 200 uL de tampão de lise suplementado com proteinase K e carreador de RNA, e os homogenatos foram incubados à 56°C durante 15 minutos. Após centrifugação em microcentrífuga refrigerada (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) à 6.800xg durante 1 minuto, o sobrenadante acrescido de etanol foi administrado à membrana da coluna de centrifugação e submetido a duas centrifugações (6.800xg, 1 minuto) consecutivas com tampão de lavagem, e o eluído com RNA viral em seguida foi obtido pela lavagem da membrana com água livre de nuclease. As amostras de RNA viral foram então armazenadas em microtubos eppendorfs livres de nuclease e acondicionadas em ultra freezer à -70°C imediatamente após a extração até o momento da síntese do DNA complementar (cDNA). A

concentração (ng/uL) e pureza (A260/A230 e A260/A280) do RNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop™2000, Thermo Fisher Scientific, EUA).

5.2.4 Síntese do cDNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O cDNA foi sintetizado com até 2 ug do RNA viral total por meio do kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Viosystem, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram adicionadas ao mix reacional constituído de todos os reagentes necessários para a ação da enzima transcriptase reversa. Em seguida, as soluções foram incubadas à 37°C durante 60 minutos, e a reação interrompida à 95°C durante 5 minutos. O experimento de qPCR foi realizado utilizando o sistema TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) em placas ópticas de 96 poços Micro Amp®Fast (Applied Biosystems, EUA) para um volume final de 20 uL por poço. Uma curva padrão de amplificação por G-Block foi construída para cada arbovírus a fim de detectar o número de réplicas de DNA viral (3 – 300000). A curva padrão, amostras, controles positivos constituídos pelo DNA isolado de cada arbovírus e controles negativos foram distribuídos em duplicatas na placa de 96 poços. A reação foi constituída de 3 uL de amostra, 3,2 uL de água ultrapura livre de nuclease, 10 uL do mastermix, 0,4 uL de BSA (5mg/mL), 1,0 uL de MgCl2 (30 mM), 0,8 uL de cada primer e 0,8 uL da 5-FAM probe primer-específica (10 mM) como corante reporter. Após a pipetagem de todos os reagentes, as placas foram seladas com filme adesivo óptico Micro Amp® (Applied Biosystems, EUA).

Os primers utilizados para amplificação do DNA viral de cada arbovírus estão descritos na Tabela 2. Os parâmetros de corrida adotados em todas as reações foram de 40 ciclos de detecção de fluorescência à 95 °C por 15 s, e anelamento à 60 °C por 1 min. Todas as reações foram conduzidas em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA) e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação específica acima do limiar de background e dentro dos 40 ciclos de reação. Nos casos de amplificação positiva, os valores de Ct (Cicle-threshold) de cada amostra foram lançados na curva padrão específica para o tipo viral amplificado para estimativa do número de réplicas de DNA viral.

Vírus	Sequência de Primers 5' – 3'	Referência
DENV	Forward: AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA Reverse: CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT Probe: 6FAM-ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACC-TAMRA	(Leparc-Goffart *et al*., 2009)
ZIKV	Forward: CCGCTGCCCAACACAAG Reverse: CCACTAACGTTGTTTTGCAGACAT Probe: 6FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-TAMRA	(Lanciotti *et al*., 2008)
CHIKV	Forward: TCGACGCGCCCTCTTTAA Reverse: ATCGAATGCACCGCACACT Probe: 6FAM-ACCAGCCTGCACCCATTCCTCAGAC-TAMRA	(Pabbaraju *et al.*, 2016)

Tabela 2. Primers e sondas utilizados para amplificação do DNA viral de cada arbovírus. DENV: vírus da dengue; ZIKV: vírus Zica; CHIKV: Vírus Chikungunya

5.2.5 Análise estatística

O estudo avaliou a associação de variáveis qualitativas independentes. O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação do LIRAa e a presença dos vírus e transmissão vertical

REFERÊNCIAS

AGARWAL, Ankita *et al.* Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in Aedes aegypti. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 8, n. 7, p. 4–9, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002990

BAHIA. SECRETARIA DE SAÚDE. **Boletim Epidemiológico das Arboviroses Urbanas, Semana Epidemiologia 6, 2020**. *[s. l.]*, 2020.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of Mosquito Vector Competence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, *[S. l.]*, v. 64, n. 1, p. 115–137, 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1128/mmbr.64.1.115-137.2000

BLACK IV, William C. *et al.* Flavivirus susceptibility in Aedes aegypti. **Archives of Medical Research**, *[S. l.]*, v. 33, n. 4, p. 379–388, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00373-9

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. Aedes aegypti: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, *[S. l.]*, v. 16, n. 4, p. 295–302, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.5123/s1679-49742007000400007

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue:** Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor, Manual de Normas Técnicas, Brasilia/ DF, p. 84, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Orientações Técnicas para Pessoal de Campo. Adaptado do Manual de Normas Técnicas do Ministério da Saúde de 2001**. *[S. l.: s. n.]*. *E-book*. Disponível em: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/manuais_cartilhas/Manual_de_Campo_Dengue.pdf

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. Brasília/ DF: *[s. n.]*, 2009. *E-book*. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Levantamento rápido para índices de Aedes argypti – LIRAa – para vigilância entomológica do Aedes aegyp**. 1º ed. Brasília/ DF: *[s. n.]*, 2013. *E-book*. Disponível em: www.saude.gov.br/svs%0Awww.saude.gov.br/bvs

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Contingência Nacional para Epidemias de Dengue**. *[S. l.: s. n.]*. *E-book*.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika). **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, *[S. l.]*, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020. Disponível em: https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf

CARRILLO-HERNÁNDEZ, Marlen Yelitza *et al.* Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infectious Diseases**, *[S. l.]*, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2018.

Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12879-018-2976-1

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. **Why is Aedes aegypti Linnaeus so Successful as a Species?**. *[S. l.]*: Neotropical Entomology, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13744-017-0520-4

CHAVES, Barbara Aparecida *et al.* Coinfection with zika virus (ZIKV) and dengue virus results in preferential ZIKV transmission by vector bite to vertebrate host. **Journal of Infectious Diseases**, *[S. l.]*, v. 218, n. 4, p. 563–571, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1093/infdis/jiy196

CHAVES, Barbara Aparecida *et al.* Vertical Transmission of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) in Amazonian Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Delays Egg Hatching and Larval Development of Progeny. **Journal of Medical Entomology**, *[S. l.]*, v. 56, n. 6, p. 1739–1744, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1093/jme/tjz110

CHRISTOPHERS, SR. **Aedes aegypti (L.). The yellow fever mosquito - its life history, bionomics and structure**. Londres: *[s. n.]*, 1960. v. 10*E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.4269/ajtmh.1961.10.112

CIOTA, Alexander T. *et al.* Vertical transmission of zika virus by Aedes aegypti and Ae. Albopictus mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, *[S. l.]*, v. 23, n. 5, p. 880–882, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.3201/eid2305.162041

COFFEY, Lark L. *et al.* **Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: Implications for the emergence of disease**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.2217/fmb.12.139

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo. **Principais Mosquitos de importância sanitária do Brasil**. 1º ed. Rio de Janeiro: Fio Cruz, 1994. *E-book*.

COSTA, Cristiano Fernandes *et al.* Transovarial transmission of DENV in Aedes aegypti in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. **Parasites and Vectors**, *[S. l.]*, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13071-017-2194-5

DELATTE, H. *et al.* **Blood-feeding behavior of aedes albopictus, a vector of chikungunya on la reunion**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=2010262819

DIAZ, Luis A. *et al.* Intertwined arbovirus transmission activity: Reassessing the transmission cycle paradigm. **Frontiers in Physiology**, *[S. l.]*, v. 3 JAN, n. January, p. 1–7, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00493

DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, *[S. l.]*, v. 51, p. 30, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2017051006889

FARNESI, Luana Cristina *et al.* Embryonic development of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae): Influence of different constant temperatures. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, *[S. l.]*, v. 104, n. 1, p. 124–126, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0074-

02762009000100020

FOCKS, Dana. **Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for**. Gainsville, Florida, USA: World Health Organization, 2004. *E-book*.

FURUYA-KANAMORI, Luis *et al.* Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. **BMC Infectious Diseases**, *[S. l.]*, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12879-016-1417-2

GOMES, Almério de Castro. Medidas dos níveis de infestação urbana para aedes (stegomyia) aegypti e aedes (stegomyia) albopictus em Programa de Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do Sus**, *[S. l.]*, v. 7, n. 3, p. 49–57, 1998. Disponível em: https://doi.org/10.5123/s0104-16731998000300006

GONÇALVES, Caroline M. *et al.* Distinct variation in vector competence among nine field populations of Aedes aegypti from a Brazilian dengue-endemic risk city. **Parasites and Vectors**, *[S. l.]*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-320

GOULD, Ernest *et al.* Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, *[S. l.]*, v. 4, p. 1–13, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001

GUBLER, Duane J. Resurgent Vector-Borne Diseases as a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, *[S. l.]*, v. 4, n. 3, p. 442–450, 1998.

GUBLER, Duane J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, *[S. l.]*, v. 951, n. 1, p. 13–24, 2006.

GÜNTHER, Jeannette *et al.* Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. **Intervirology**, *[S. l.]*, v. 50, n. 5, p. 347–352, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1159/000107272

GUZMAN, Maria G.; HARRIS, Eva. Dengue. **The Lancet**, *[S. l.]*, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9

HARRINGTON, LAURA C.; EDMAN, JOHN D.; SCOTT, THOMAS W. Why Do Female Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood? **Journal of Medical Entomology**, *[S. l.]*, v. 38, n. 3, p. 411–422, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.3.411

HONÓRIO, Nildimar Alves *et al.* Experimental vertical transmission of chikungunya virus by brazilian and florida aedes albopictus populations. **Viruses**, *[S. l.]*, v. 11, n. 4, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3390/v11040353

HOSSAIN, Mohammad Sorowar *et al.* Chikungunya outbreak (2017) in Bangladesh: Clinical profile, economic impact and quality of life during the acute phase of the disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 12, n. 6, p. 1–16, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006561

KRAEMER, Moritz U. G. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. Albopictus. **eLife**, *[S. l.]*, v. 4, n. June, p. 1–18, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.7554/eLife.08347

KRAEMER, Moritz U. G. *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Aedes albopictus. **Nature Microbiology**, *[S. l.]*, v. 4, n. 5, p. 854–863, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y

KUNO, Goro; CHANG, Gwong Jen J. **Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.608-637.2005

LANCIOTTI, Robert S. *et al.* **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3201/eid1408.080287

LEPARC-GOFFART, Isabelle *et al.* Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. **Journal of Clinical Virology**, *[S. l.]*, v. 45, n. 1, p. 61–66, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.02.010

LEQUIME, Sebastian; LAMBRECHTS, Louis. Infection , Genetics and Evolution Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes : A historical perspective. **INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION**, *[S. l.]*, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.025

LEQUIME, Sebastian; PAUL, Richard E.; LAMBRECHTS, Louis. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. **PLoS Pathogens**, *[S. l.]*, v. 12, n. 5, p. 1–14, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548

LOUNIBOS, L. P. Habitat segregation among African treehole mosquitoes. **Ecological Entomology**, *[S. l.]*, v. 6, n. 2, p. 129–154, 1981. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1981.tb00601.x

MACKENZIE, John S.; GUBLER, Duane J.; PETERSEN, Lyle R. Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of japanese encephalitis, west nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, *[S. l.]*, v. 10, n. 12S, p. S98–S109, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nm1144

MARQUES, C. C. *et al.* Estudo comparativo de eficácia de larvitrampas e ovitrampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. **Revista de Saude Publica**, *[S. l.]*, v. 27, n. 4, p. 237–241, 1993. Disponível em: https://doi.org/10.1590/s0034-89101993000400002

MATTINGLY, P. F. Genetical Aspects of the Aëdes Aegypti problem. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, *[S. l.]*, v. 52, n. 1, p. 5–17, 1958. Disponível em: https://doi.org/10.1080/00034983.1958.11685838

MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika Virus Fact Sheet. **WPRO Fact Sheets**, *[S. l.]*, v. 29, n. 3, p. 1-, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15.Address

PANIZ-MONDOLFI, Alberto E. *et al.* ChikDenMaZika Syndrome: The challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, *[S. l.]*, v. 15, n. 1, p. 1–4, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12941-016-0157-x

PEREIRA, Sheila Tavares *et al.* Role of Egg Buster in Hatching of <I>Aedes aegypti</I>: Scanning Electron Microscopy Study. **Journal of Medical Entomology**, *[S. l.]*, v. 43, n. 1, p. 68–72, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)043[0068:roebih]2.0.co;2

PESSOA, Rodrigo *et al.* Investigation into an outbreak of dengue-like illness in pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of Zika, Chikungunya, and dengue virus type 1. **Medicine (United States)**, *[S. l.]*, v. 95, n. 12, p. 1–9, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003201

PHUMEE, Atchara *et al.* Vertical transmission of Zika virus in Culex quinquefasciatus Say and Aedes aegypti (L.) mosquitoes. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-019-41727-8

POWELL, Jeffrey R. New contender for most lethal animal. **Nature**, *[S. l.]*, v. 540, n. 7634, p. 525, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1038/540525b

POWELL, Jeffrey R.; GLORIA-SORIA, Andrea; KOTSAKIOZI, Panayiota. Recent history of Aedes aegypti: Vector genomics and epidemiology records. **BioScience**, *[S. l.]*, v. 68, n. 11, p. 854–860, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1093/biosci/biy119

POWELL, Jeffrey R.; TABACHNICK, Walter J. History of domestication and spread of Aedes aegypti--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, *[S. l.]*, v. 108, n. 8, p. 11–17, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1590/0074-0276130395

ROOT, J. Jeffrey *et al.* Experimental infection of fox squirrels (Sciurus niger) with West Nile virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, *[S. l.]*, v. 75, n. 4, p. 697–701, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.697

RÜCKERT, Claudia *et al.* Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes. **Nature Communications**, *[S. l.]*, v. 8, n. May, p. 1–9, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1038/ncomms15412

RÜCKERT, Claudia; EBEL, Gregory D. How Do Virus–Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence? **Trends in Parasitology**, *[S. l.]*, v. 34, n. 4, p. 310–321, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.12.004

RYAN, Sadie J. *et al.* Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 13, n. 3, p. 1–20, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007213

SILVA, Carlos Eduardo; LIMONGI, Jean Ezequiel. Avaliação comparativa da eficiência de armadilhas para a captura e coleta de Aedes aegypti em condições de campo. **Cadernos Saúde Coletiva**, *[S. l.]*, v. 26, n. 3, p. 241–248, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1414-462x201800030045

SMITH, Darci R. *et al.* Infection and dissemination of venezuelan equine encephalitis virus in the epidemic mosquito vector, Aedes taeniorhynchus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, *[S. l.]*, v. 77, n. 1, p. 176–187, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.176

SONG, Byung-hak *et al.* Zika virus : History , epidemiology , transmission , and clinical

presentation. **Journal of Neuroimmunology**, *[S. l.]*, v. 308, p. 50–64, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001

SOUZA-NETO, Jayme A.; POWELL, Jeffrey R.; BONIZZONI, Mariangela. Aedes aegypti vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, *[S. l.]*, v. 67, n. September 2018, p. 191–209, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009

STANAWAY, Jeffrey D. *et al.* The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious Diseases**, *[S. l.]*, v. 16, n. 6, p. 712–723, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00026-8

TEICH, Vanessa; ARINELLI, Roberta; FAHHAM, Lucas. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, *[S. l.]*, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.21115/jbes.v9.n3.p267-76

THANGAMANI, Saravanan *et al.* Vertical transmission of zika virus in aedes aegypti mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, *[S. l.]*, v. 95, n. 5, p. 1169–1173, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0448

THIBERVILLE, Simon Djamel *et al.* Chikungunya Fever: A Clinical and Virological Investigation of Outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 7, n. 1, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002004

VAIRO, Francesco *et al.* Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 33, n. 4, p. 1003–1025, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.006

VOGELS, Chantal B. F. *et al.* Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? **PLoS Biology**, *[S. l.]*, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000130

WAGGONER, Jesse J. *et al.* Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection. **Journal of Clinical Virology**, *[S. l.]*, v. 78, p. 57–61, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.01.007

WEAVER, Scott C. *et al.* Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review of Medicine**, *[S. l.]*, v. 69, n. 1, p. 395–408, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, *[S. l.]*, v. 85, n. 2, p. 328–345, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008

WHO. **Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever**. *[S. l.: s. n.]*. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

WU, Pa *et al.* Arbovirus lifecycle in mosquito: Acquisition, propagation and transmission. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, *[S. l.]*, v. 21, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1017/erm.2018.6

CAPÍTULO 1

Fabrício Freire de Melo

Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Rua Hormindo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58, Vitória da Conquista 45029-094, Bahia, Brazil.

Phone: +5577 9196-8134

E-mail: freiremelo@yahoo.com.br

Simultaneous circulation of Zika, Dengue, and Chikungunya and vertical co-transmission to *Aedes aegypti*

Adriano Fernandes Teixeira[a], Breno Bittencourt de Brito[a], Thiago Macêdo Lopes Correia[a], Airton Idalécio Sousa Viana[a], Juliana Cabral Carvalho[a], Filipe Antônio França da Silva[a], Maria Luísa Cordeiro Santos[a], Eliezer Almeida da Silveira[b], Henry Paul Granger Neto[a], Natalia Maria Pereira da Silva[a], Cínthya Viana Souza Rocha[a], Fillipe Dantas Pinheiro[a], Bárbara Aparecida Chaves[c], Wuelton Marcelo Monteiro[c], Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda[c,d], Nágila Francinete Costa Secundino[e,f], Paulo Filemon Paolucci Pimenta[c,e,f], and Fabrício Freire de Melo[a].

[a] Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Rua Hormindo Barros, 58, Candeias, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. Postal code: 45029-094

[b] Secretaria Municipal de Saúde de Vitória da Conquista, Rua Rotary Club, 69, Centro, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. Postal code: 45040-150

[c] Instituto de Pesquisas Clínicas Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Avenida Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus, Amazonas, Brazil. Postal code: 69040-000

[d] Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-AM, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, Brazil. Postal code: 69057-070.

[e] Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Avenida Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus, Amazonas, Brazil. Postal code: 69040-000.

[f] Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-MG, Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Postal code: 30190-002.

ABSTRACT

The outbreaks caused by the *Aedes aegypti*-transmitted dengue virus (DENV), zika virus (ZIKV), and chikungunya virus (CHIKV) result in a significant impact to the health systems of tropical countries. Furthermore, the occurrence of patients coinfected by at least two of these arboviruses is an aggravating factor in that scenario. *Ae. Aegypti* eggs were collected in the city of Vitória da Conquista, in Bahia State, Brazil, and subsequently hatched into larvae, which were analyzed in pools or individually for the presence of DENV, ZIKV, and CHIKV by molecular biology methods. Thirty larvae pools were analyzed, and sixteen (53.3%) of them were detected positive for DENV, ZIKV, and/or CHIKV. Among the individually analyzed larvae (n=30), nine (30%) were positive for any of these arboviruses, and four (13.3%) were simultaneously coinfected by DENV and ZIKV. The simultaneous *Ae. aegypti* larvae infection by two different arboviruses is an unprecedented finding. This result suggests the occurrence of a vertical arboviruses co-transmission from the female mosquito to its offspring in nature. The occurrence of concomitant circulation of DENV, ZIKV, and CHIKV in *Ae. aegypti* from a single study region had also never been documented by previous studies.

Keywords: Dengue, Zika, Chikungunya, Vertical transmission, Cotransmission

INTRODUCTION

There are about 530 types of arboviruses distributed into four genera: Flavivirus, Alphavirus, Orthobunyavirus, and Phlebovirus (Majumder et al., 2018). Some of these mainly from the genera Flavivirus and Alphavirus are causative agents of several different human diseases. Dengue Virus (DENV), Zika Virus (ZIKV), Chikungunya virus (CHIKV) lead to severe diseases (Gubler, 1998). Besides the unquestionable impact in health and the quality of life of affected individuals, they also represent a substantial economic burden for the health systems. Only in Brazil, during the 2016 outbreak, 560 million dollars were spent with vector-control actions and medical costs (Teich et al., 2017).

Understanding the vector interaction with the human arboviruses and their transmission cycle is essential for preventing the viral perpetuation and the emergence of outbreaks (Root et al., 2006; Kuno and Chang, 2005). The human arboviruses have a similar transmission cycle having *Aedes aegypti* as the primary vector (Musso et al., 2015). More than half of the world's human population lives in areas infested with this mosquito, under constant risk of outbreaks. *Ae. aegypti* stands as the primary urban vector for DENV, CHIKV, and ZIKV in many cities of the American continent (World Health Organization, 2016)**.** People living in arbovirus-endemic tropical regions have been simultaneously infected by multiple combinations of DENV, ZIKV, and CHIKV (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015; Furuya-Kanamori et al., 2016; Villamil-Gómez et al., 2016; Zambrano et al., 2016). It is considered that human coinfection may either caused by simultaneous transmission by single multiple infected vector or sequential transmission by distinct infected mosquitoes with different arboviruses. Experimental studies have demonstrated that the mosquito vectors can be infected and simultaneously transmit different arboviruses by the bite to the vertebrate host (Chaves et al., 2018).

Arboviruses are mainly transmitted horizontally to humans by the bite of infected female mosquitoes in sporadic outbreaks with an interval of years, or annually in a cyclical, seasonal pattern (Mota et al., 2016). The vector becomes infected by taking a blood meal from a viremic person. After the extrinsic period, the time between the virus ingestion, invasion of several organs, the life cycle is completed with the invasion of the salivary gland, when the vector can transmit the arbovirus by a bite to a new human host (Carrington and Simmons, 2014). Nevertheless, arboviruses can be maternally transmitted by infected females to their offspring to ensure virus survival during adverse conditions for horizontal transmission. Vertical Transmission (VT) may occur when the virus infects the germinal tissues of the female mosquitoes and or when the virus infects the egg during oviposition (Rückert et al., 2017; Lequime and Lambrechts, 2016; Adams and Boots, 2010). The VT allows the arboviruses to remain in an environment favoring endemic maintenance. The *Ae. aegypti* eggs are long-time resistant to desiccation, keeping viable until subsequent rainy periods (Thenmozhi et al., 2000; Angel B and Joshi, 2008). Thus, VT is an important endemic maintenance mechanism for human arboviruses in nature.

This study was conducted in Vitória da Conquista, a city in the State of Bahia, Brazil. This city has been recently affected by significant outbreaks of arboviral diseases (Secretary of Health of the Bahia State, 2020). The first Dengue epidemic registered in the State of Bahia dates from 1987, and cases of Chikungunya and Zika fevers were firstly diagnosed in 2014 and 2015, respectively (Teixeira et al., 2001; Secretary of Health of the Bahia State, 2014; Zanluca et al., 2015). In this context, we evaluated the potential circulation of DENV, ZIKV, and CHIKV in *Ae. aegypti* larvae from field-collected eggs during an inter-epidemic period. Here, for the first time, we find evidence of simultaneous infection in single *Ae. aegypti* larvae, which indicates the existence of vertical co-transmission of such arboviruses.

METHODS

Study Area

Vitória da Conquista is a city located in the State of Bahia, in Northeastern Brazil, at latitude 14º 51' 58" S, longitude 40º 50' 22" W and a level of 923 meters above sea level with an area of 3.704.018 Km² and estimated population of 306.866 inhabitants. The climate is tropical sub-humid to dry with significant climatic variations. The average annual temperature is 20,2 ºC (Superintendence of Economic and Social Studies of Bahia State, 2013; City Hall of Vitória da Conquista, 2012). Between April and August, the precipitations have characteristics of haze; between October and March, the rains are heavier (City Hall of Vitória da Conquista, 2012). The Secretary of Health divides the city into five health geographic regions.

Egg Collection and "Rapid Survey of *Aedes aegypti* Infestation Indexes" (LIRAa)

The eggs were collected with 50 ovitraps distributed into the five health geographic regions around the city from April to May 2019 (Fig. 1A). The ovitraps were placed for 5 days in distinct points of the city following the Secretary Health logistics considering previous knowledge of the *Ae. aegypti* presence for the annual LIRAa. In summary, the first step to measure the LIRAa is to calculate the sample according to the number of properties and population density using cluster sampling (Ministry of Health of Brazil, 2009). City blocks are considered primary units, and properties are considered secondary units. Municipalities are divided into strata with similar social and environmental characteristics. In this methodology, the blocks receive a sequential numbering by neighborhood given by the service staff from the city government. Each stratum consists of a minimum of 8.100 and a maximum of 12.000 properties. It is necessary to calculate an independent sample, and within the selected blocks, 20% of the properties should be inspected. The more common indexes are Building index (Positives Properties/ Survey properties x 100), Breteau Index (Positive vessel/ Survey

properties x 100), and Kind of vessel index (Positive Vessels/ Total vessel x 100) (Ministry of Health of Brazil, 2009).

Aedes aegypti Larvae Assortment

The eggs were hatched in an insectary at a temperature of 28°C and relative humidity of 80%. To avoid possible contamination during the non-infected larva's breading by proximity with the infected field larva (Du et al., 2019), the water used to breed the larvae underwent a continuous and rigorous quality control, including the detection of viral contaminants. The larvae were fed with fish food until the L2 to L3 stages and identified using a dichotomous key (Consoli and Oliveira, 1994). The *Ae*. *aegypti* larvae were catalogued according to the health administrative districts and divided into 30 pools of 15 individuals. Each pool was molecularly analyzed for the presence of the target arboviruses, as described below. Additionally, 30 larvae from the North and West regionals were randomly separated immediately after the eclosion of about 250 eggs. Each larva was bred in a separate small container. They were individually analyzed to determine comparative vertical transmission rates of each circulating arbovirus, including in possible coinfected larvae. These two representative regions were selected due to the early local detection of circulating arboviral coinfection in larva pools by previous analysis (data not shown). The number of individuals analyzed larvae corresponds to the number of pools previously considered optimal sample size similar to our previous detection of arboviral infection rates of field-collected adult *Aedes* mosquitoes (Bezerra, et al., 2016; Gonçalves et al., 2014).

Molecular Analysis of Vertical Transmission and Coinfection Detection

The larvae were thoroughly washed three times in PBS (Phosphate Buffer Saline), quickly cooled down to −20 °C and placed in Eppendorf tubes, and transferred to a −70 °C freezer until the time to be processed. The larvae were macerated, and RNA extracted using the commercial

PureLink® Viral RNA/DNA mini kit (Invitrogen, USA) following the manufacturer's guidelines. The cDNA was synthesized with up to 2µg of the total viral RNA using the High-Capacity RNA-to-cDNA™ reverse transcription kit (Applied Biosystem, USA), following the manufacturer's instructions. The qPCR experiment was performed using the TaqMan 2x Universal PCR Master Mix system (Thermo Fisher Scientific, USA) on Micro AmpFast 96-well optical plates (Applied Biosystems, USA). Primers and probe sets specific for DENV, ZIKV, and CHIKV were designed as previously described (Leparc-Goffart et al., 2009; Lanciotti et al., 2008; Waggoner et al., 2016). A standard G-Block amplification curve was constructed for each arbovirus. The standard curve, samples, positive control (constituted by the cDNA isolated from each arbovirus) and negative controls were distributed in duplicates in the 96-well plate. The run parameters adopted in all reactions were 40 cycles of fluorescence detection at 95°C for 15 s, and annealing at 60°C for 1 min. All reactions were conducted in a StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystems, USA), and samples that showed specific amplification above the background threshold and within the 40 reaction cycles were considered positive. In the cases of positive amplification, the Ct (Cycle-threshold) values of each sample were placed on the standard curve specific for the amplified viral type to estimate the number of replicates of viral cDNA.

The vertical transmission values were measured from the total number of positive pools versus the total number of pools analyzed and expressed as a percentage. The minimum infection rate (MIR) was calculated from the total number of *Ae. aegypti* larvae divided by the total number of positive larvae pools multiplied by 1,000.

Statistical Analysis

To evaluate significant association between infestation index and arbovirus circulation in larva, a Chi-square test of independence was performed to examine the association between the arboviruses detection and the LIRAa calculated for the area where each ovitrap was located.

Ethics Approval

This study was conducted in accordance with the Manual for the Use of Animals, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health of Brazil (national decree 3179). Also, the following committees approved this study: (a) Ethics Committee for the Use of Animals, Oswaldo Cruz Foundation (number L-1715), (b) the Ethics Committee for the Use of Animals, Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia (number 041/2016), and (c) the Animal Research Ethics Committee of Tropical Medicine, Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (002380/2016). Permits regarding land use and collection of mosquitoes were provided by the Brazilian Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Ministry of Environment of Brazil (Registration number: 57525). No privately owned or protected land was accessed. No protected or sensitive animals or plants were sampled.

RESULTS

A total of 450 larvae were obtained from the 50 ovitraps, and they were divided in 30 pools of 15 individuals according to the amount earned in the health administrative districts: North (n=5), South (n=8), East (n=5), West (n=15), and Center (n=2). Thirty-seven ovitraps (74%) were positive for the presence of eggs. Among them, 60% (n=30) had hatched *Ae. aegypti* eggs with viable larvae. The *Ae. aegypti* infestation index values determined by LIRAa was higher than 4 in the areas of 42% ovitraps (n=21) but lower than 4 in 38% (n=29) of other places (Fig. 1A).

Among the 30 analyzed pools obtained from the ovitraps, sixteen (53.3%) were positive for at least one arbovirus: eight pools (26.7%) were positive for ZIKV in the South (n= 3), West (n= 3), and North (n=2) regionals; 16.7% (n=5) of pools for CHIKV in the South (n=3) and Center (n=2) regionals; and 13.3% (n=4) of pools for DENV in the West (n=3) and Center (n=1) regionals. Only one pool was simultaneously positive for CHIKV and DENV in the Center regional. None infected pool (n=0) was detected in the East regional (Fig. 1B).

A total of 53.3% VT rate was detected in the whole city for any with striking differences in the health administrative regions: 100% in the Center, 75% in the South, 66.67% in the North, 40% in the West and 0% in the East region. The MIR of 28.13/1000 was observed in the entire city. The association between positive arbovirus detection and LIRAa >4 was significant, X^2 (4, N=50) = 5.8, p = .016.

Among the individual analyses of the 30 larvae collected in the North and West regionals, 30% (9) were single infected for any of the target arboviruses, being 13.3% (n=4) positive for DENV and 3.3% (n=1) for ZIKV. None larva was positive for CHIKV. However, 13.3% (n=4) of the larvae were coinfected by DENV and ZIKV (Fig. 1C).

DISCUSSION

The three main arboviruses transmitted by the *Ae. aegypti* that are circulating in Brazil have been present in Vitória da Conquista, the focus of this study, causing several outbreaks of arboviral diseases in the last years. According to the Secretary of Health of the State of Bahia there were 56,342 cases of Dengue (380.4 cases/100,000 inhabitants), 1,724 cases of Zika (11.6 cases/100,000 inhabitants), and 107 cases of Chikungunya (0,8 cases/100,000 inhabitants) during the first three months of 2019 (Secretary of Health of the Bahia State, 2020). This study confirmed VT's simultaneous presence of three human arboviruses (DENV, ZIKV, and CHIKV) in *Ae. aegypti* larvae during transmission season in the Vitória da Conquista, a city at

the South-Central of Bahia, a state of Northeastern Brazil. This atypical simultaneous circulation of arboviruses is responsible for the uncommon triple endemic condition observed in the region. Previous studies detected the circulation of the four DENV serotypes in the Brazilian cities of the Amazon basin (da Costa, 2017). Moreover, ZIKV and CHIKV were detected in *Ae. aegypti* larvae collected in nature in Brazilian Amazon (da Costa, 2018). Nevertheless, according to our knowledge, until today, there is no identification of concomitant field circulation of these three arboviruses detected by VT in the *Ae. aegypti* from the same endemic region. Interestingly, the viral detection pattern of the pool analysis (ZIKV > CHIKV > DENV) does not correlate directly with the data mentioned above of human cases registered in the study city between the first 3 months of 2019 (Secretary of Health of the Bahia State, 2020). Probably due to many asymptomatic and/or mild arboviral infections in humans, mainly when ZIKV infects them (Kantor, 2016). That leads to an underreporting of case numbers by the health authorities.

Some simplified methods have been used to obtain *Ae. aegypti* infestation indexes and distribution. The possibility of implementing a system that quickly provides infestation indexes allowing local control programs to orientate actions to the identified critical areas.

The rapid survey of *Ae. aegypti* infestation index by LIRAa is an important simplified method and mandatory for all Brazilian cities with more than 2000 inhabitants. When an above-four LIRAa value is obtained in a given region, it is considered that such a place is under risk of Dengue outbreak (Ministry of Health of Brazil, 2019). In our study, the association between LIRAa index and arboviruses circulation was significant. This finding adds information to the data from classical previous studies, which have proven that LIRAa can be used as an effective xenomonitoring tool for DENV (Coelho, 2008), though here we demonstrate that these indexes seem also properly to correlate with the circulation of CHIKV and ZIKV. The viral detection analysis of pooled 450 larvae collected for 5 consecutive days from all regions following

previous knowledge *Ae. aegypti* presence by LIRAa methodology showed the differences in the amount of arbovirus circulating in the city (ZIKV > CHIKV > DENV).

Additionally, the pattern of viral detection among individual larva is not representative of the pattern observed in the analyzed pools. The single larvae were from only two regions in which a simultaneous circulation of arboviruses was detected in pools during an exploratory study. Essentially, the analysis of individual larva was to investigate the occurrence of simultaneous transovarial transmission of more than one arbovirus. It was not considered to represent the pattern of arboviral circulation already observed in the analysis of larva pools.

The detection of individual *Ae. aegypti* larvae coinfected by two distinct arboviruses is another unprecedented finding of our study. This result indicates a simultaneous vertical transmission of DENV and ZIKV from mosquito females resulting in coinfected offsprings. Several recent reports of coinfected humans by ZIKV, DENV, and/or CHIKV raised the possibility of co-transmission of these arboviruses to the vertebrate host by a single vector bite (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015; Furuya-Kanamori et al., 2016; Villamil-Gómez et al., 2016; Zambrano et al., 2016). As an example, a study that included 182 febrile patients from Thailand observed 6 patients coinfected by DENV and CHIKV, as well as 1 patient with a DENV and ZIKV coinfection (Suwanmanee et al., 2018).

Moreover, Mexican colonized *Ae. aegypti* that were experimentally coinfected by DENV, ZIKV, and CHIKV presented these viruses in their saliva simultaneously, indicating that the three arboviruses can be transmitted to the vertebrate host by a single mosquito (Rückert et al., 2017). At the experiments, it was also verified that the co-transmission rates were similar than single transmission rates for DENV-2 and ZIKV, but lower for CHIKV. Moreover, it was previously demonstrated by our group that experimentally *Ae. aegypti* can be coinfected with DENV and ZIKV but preferentially transmit ZIKV by mosquito bites (Chaves et al. 2018). Our

field-collected coinfected larvae also presented a higher number of ZIKV when compared to DENV. In addition, such a phenomenon corroborates the evidence supporting the maintenance of arboviruses circulation by VT during multiple epidemic periods

ACKNOWLEDGMENTS

Groups. The Secretary of Health of Vitória da Conquista, Bahia, provided the field-agents to contribute to this study.

Granting institutions. PPSUS program of the Bahia State Research Support Foundation (FAPESB); Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz); Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG); Federal University of Bahia (UFBA); Amazonas State Research Support Foundation (FAPEAM/PAPAC); Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES).

Grant numbers: PPSUS/FAPESB (SUS0037/2018); CNPq (425993/2016-7 and 440615/2016-0); FAPEMIG (APQ-03002-16 and PPM-00728-18); CAPES (88881.130833/2016-01).

AUTHOR CONTRIBUTION

The two last authors (P.F.P.P. and F.F.M.) coordinated the production, performed literature review and analysis, drafting, critical revision, and equally contributed to this article. The first author (A.F.T.) leaded the production of this article, being responsible for the study conception, design, and analysis as well as for leading its writing. The second author (B.B.B.) contributed with experiments performance, literature review and analysis, drafting, editing, and writing. All the other authors equally contributed to this paper with experiments performance, literature review and analysis, editing, and final approval of the final version.

References

Adams B., M. Boots. 2010. How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. Epidemics. 2(1):1-10.

Angel B, V. Joshi. 2008. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in Aedes mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. J. Vector Borne Dis. 45(1):56-9.

Bezerra J. M. T., R. G. P. Araújo, F. F. Melo, C. M. Gonçalves, B. A. Chaves, B. M. Silva, L. D. Silva, S. T. Brandão, N. F. C. Secundino, D. E. Norris, P. F. P. Pimenta. 2016. Aedes (Stegomyia) albopictus' dynamics influenced by spatiotemporal characteristics in a Brazilian dengue-endemic risk city. Acta Trop. 164:431-437.

Carrington L. B., C. P. Simmons. 2014. Human to mosquito transmission of dengue viruses. Front. Immunol. 17;5:290.

Chaves B. A., A. S. Orfano, P. M. Nogueira, N. B. Rodrigues, T. B. Campolina, R. Nacif-Pimenta, A. C. A. M. Pires, A. B. V. Júnior, A. D. C. Paz, E. B. D. C. Vaz, M. D. G. V. B. Guerra, B. M. Silva, F. F. de Melo, D. E. Norris, M. V. G. de Lacerda, P. F. P. Pimenta, N. F. C. Secundino. 2018. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. J. Infect. Dis. 13;218(4):563-571.

City Hall of Vitória da Conquista. Geografia. [Internet]. 2012. Vitória da Conquista: City Hall of Vitória da Conquista. https://www.pmvc.ba.gov.br/geografia/

Coelho G. E. 2008. Relação entre o índice de infestação predial (IIP), obtido pelo levantamento rápido (LIRAa) e intensidade de circulação do vírus do dengue. [Internet]. https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/10294/1/1111.pdf

Consoli R. A. G. B., Oliveira R. L. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 228.

da Costa C. F., A. V. da Silva, V. A. do Nascimento, V. C. de Souza, D. C. D. S. Monteiro, Terrazas W. C. M., R. A. Dos Passos, S. Nascimento, J. B. P. Lima, F. G. Naveca. 2018. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of Aedes aegypti in the Brazilian Amazon. PLOS Negl Trop Dis. 12(7):e0006594.

da Costa C. F., R. A. Dos Passos, J. B. P. Lima, R. A. Roque, V. de Souza Sampaio, T. B. Campolina, N. F. C. Secundino, P. F. P. Pimenta. 2017. Transovarial transmission of DENV in Aedes aegypti in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. Parasit Vectors. 10(1):249.

Du S., Y. Liu, J. Liu, J. Zhao, C. Champagne, L. Tong, R. Zhang, F. Zhang, C. F. Qin, P. Ma, C. H. Chen, G. Liang, Q. Liu, P. Y. Shi, B. Cazelles, P. Wang, H. Tian, G. Cheng. 2019. Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. Nat. Commun. 10(1):1324.

Dupont-Rouzeyrol M., O. O'Connor, E. Calvez, M. Daurès, M. John, J. P. Grangeon, A. C. Gourinat. 2015. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. Emerg. Infect. Dis. 21(2):381-2.

Furuya-Kanamori L., S. Liang, G. Milinovich, R. J. Soares Magalhaes, A. C. Clements, W. Hu, P. Brasil, F. D. Frentiu, R. Dunning, L. Yakob. 2016. Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. BMC Infect Dis. 16:188.

Gonçalves C. M., F. F. Melo, J. M. Bezerra, B. A. Chaves, B. M. Silva, L. D. Silva, J. E. Pessanha, J. R. Arias, N. F. Secundino, D. E. Norris, P. F. & Pimenta. 2014. Distinct variation in vector competence among nine field populations of Aedes aegypti from a Brazilian dengue-endemic risk city. Parasit Vectors. 7:320.

Gubler D. J. 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. Emerg. Infect. Dis. 4(3):442-50.

Kantor I. N. 2016. Dengue, Zika and Chikungunya. Medicina (B Aires). 76(2):93-97

Kuno G., G. B. Chang. 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. Clin. Microbiol. Rev.18(4):608-37.

Lanciotti R. S., O. L. Kosoy, J. J. Laven, J. O. Velez, A. J. Lambert, A. J. Johnson, S. M. Stanfield, M. R. Duffy. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg. Infect. Dis. 14(8):1232-9.

Leparc-Goffart I., M. Baragatti, S. Temmam, A. Tuiskunen, G. Moureau, R. Charrel, X. de Lamballerie. 2009. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. J. Clin. Virol. 45(1):61-6.

Lequime S., R. E. Paul, L. Lambrechts. 2016. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. PLOS Pathog. 12(5):e1005548.

Marchi S, Trombetta CM, Montomoli E. 2018. Chapter 2 - Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases as a Global Health Problem, pp. 25-46. Majumder A. A., R. Kabir, S. Rahman. Public Health - Emerging and Re-emerging Issues. UK

Ministry of Health of Brazil. 2009. Levantamento Rápido do Índice de Infestação por Aedes aegypti LIRAa [Internet]. https://www.dengue.org.br/dengue_levantamento_municipios.pdf

Ministry of Health of Brazil. 2013. Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti – LIRAa para Vigilância Entomológica do Aedes aegypti no Brasil [Internet]. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_liraa_2013.pdf

Mota M.T., A. C. Terzian, M. L. Silva, C. Estofolete, M. L. Nogueira. 2016. Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge. Braz. J. Microbiol. 47 Suppl 1(Suppl 1):38-50.

Musso D., V. M. Cao-Lormeau, D. J. Gubler. 2015. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? Lancet. 386(9990):243-4.

Root J. J., P. T. Oesterle, N. M. Nemeth, K. Klenk, D. H. Gould, R. G. McLean, L. Clark, J. S. Hall. 2006. Experimental infection of fox squirrels (Sciurus niger) with West Nile virus. Am J Trop Med Hyg. 75(4):697-701.

Rückert C., J. Weger-Lucarelli, S. M. Garcia-Luna, M. C. Young, A. D. Byas, R. A. Murrieta, J. R. Fauver, G. D. Ebel. 2017. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes. Nat. Commun. 8:15412.

Secretary of Health of the State of Bahia. 2020. Boletim Epidemiológico de Arboviroses, Bahia. [Internet]. http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Janeiro-2019-Boletim-Epidemiol%C3%B3gico-de-Arboviroses.pdf

Secretary of Health of the State of Bahia. 2014. Boletim Epidemiológico da febre chikungunya na Bahia. [Internet]. http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim_Chikungunya_BA_N7_12112014.pdf

Superintendence of Economic and Social Studies of Bahia. 2013. Estatísticas dos Municípios Baianos. 1rd. Rev, pp. 433-452.

Suwanmanee S., P. Surasombatpattana, N. Soonthornworasiri, R. Hamel, P. Maneekan, D. Missé, N. Luplertlop. 2018. Monitoring arbovirus in Thailand: Surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. Acta Trop. 188:244

Teich V., R. Arinelli, 2017. Fahham L. Aedes aegypti and society: the economic burden of arboviruses in Brazil. J. Bras. Econ. Saúde. 9(3): 267-276.

Teixeira M.G., M. C. N. Costa, M. L. Barreto, F. R. Barreto. 2001. Epidemiologia do dengue em Salvador-Bahia,1995-1999. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 34(3), 269-274.

Thenmozhi V., S. C. Tewari, R. Manavalan, A. Balasubramanian, A. Gajanana. 2000. Natural vertical transmission of dengue viruses in Aedes aegypt in southern India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94(5):507.

Villamil-Gómez W. E., A. J. Rodríguez-Morales, A. M. Uribe-García, E. González-Arismendy, J. E. Castellanos, E. P. Calvo, M. Álvarez-Mon, D. Musso. 2016. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. Int. J. Infect. Dis. 51:135-138.

Waggoner J. J., G. Ballesteros, L. Gresh, A. Mohamed-Hadley, Y. Tellez, M. K. Sahoo, J. Abeynayake, A. Balmaseda, E. Harris, B. A. Pinsky. 2016. Clinical evaluation of a single-

reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection. J. Clin. Virol. 78:57-61.

World Health Organization. 2016. Regional Office for Europe Zika virus vectors and risk of spread in the WHO European Region [Internet]. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/304459/WEB-news_competence-of-Aedes-aegypti-and-albopic/tus-vector-species.pdf?ua=1

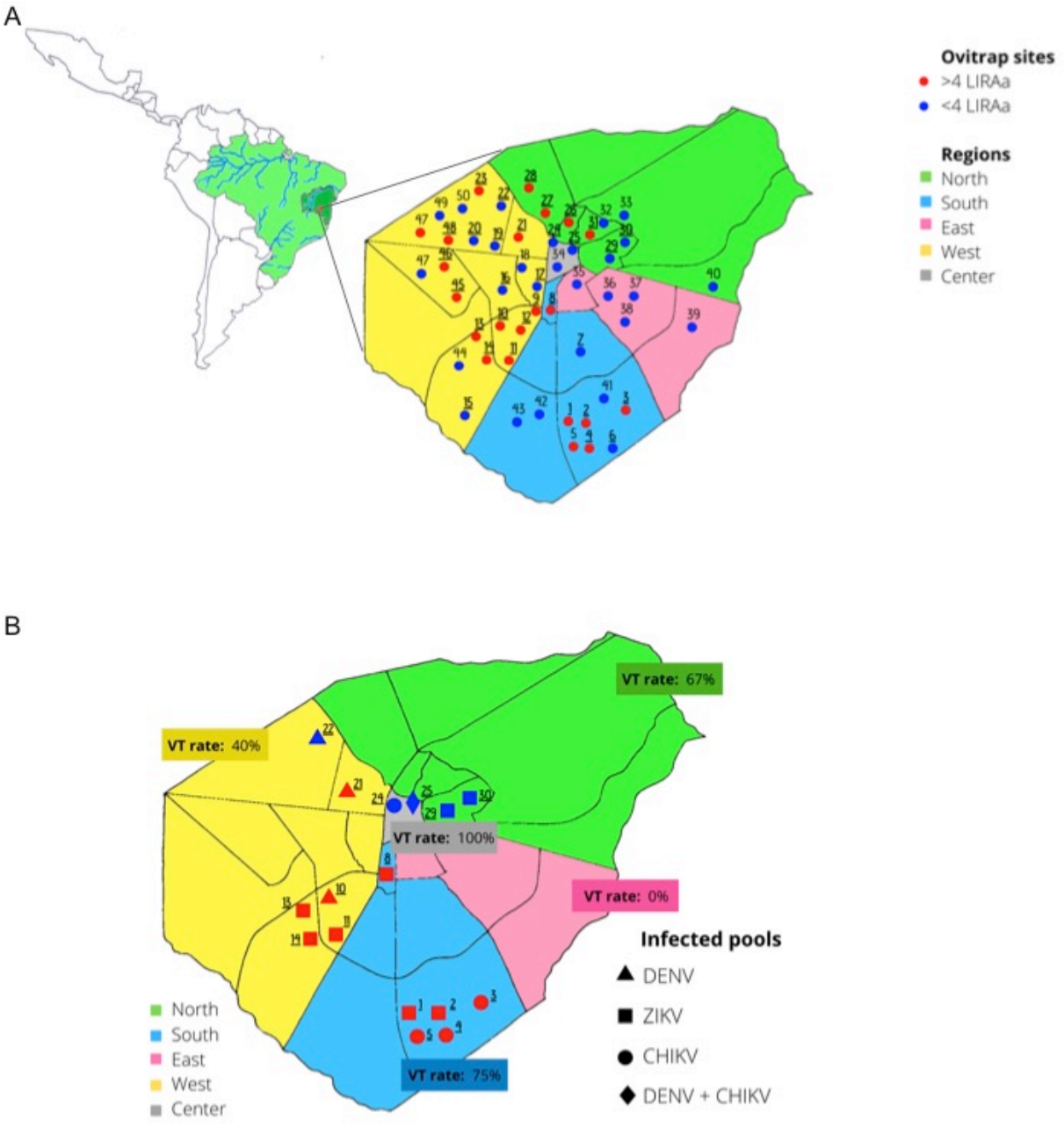
Zambrano H., J. J. Waggoner, C. Almeida, L. Rivera, J. Q. Benjamin, B. A. Pinsky. 2016. Zika Virus and Chikungunya Virus CoInfections: A Series of Three Cases from a Single Center in Ecuador. Am. J. Trop. Med. Hyg. 95(4):894-896.

Zanluca C., V. C. Melo, A. L. Mosimann, G. I. Santos, C. N. Santos, K. Luz. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 110(4):569-72.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Ovitraps location and arboviruses detection. A- Map of Brazil (left side) showing the geographic localization of the Vitória da Conquista City in the Northeastern region. The city is divided into five health administrative regionals according to their geographic position (right side). The colored spots are showing the distribution of 50 ovitraps. The red and blue spots are ovitraps that presented infestation indexes above and bellow 4, respectively. The spots whose numbers are underlined represent the ovitraps that provided viable larvae. **B-** Map of the city showing 53.3% of infected ovitraps for DENV (▲) , ZIKV (■), CHIKV (●), and DENV + CHIKV (♦). The VT rates are presented for each administrative regionals. **C-** Distribution of individually analyzed larvae that were positive for arboviruses. DENV: Dengue virus; ZIKV: Zika virus; CHIKV: Chikungunya virus.

FIGURE 1


A
Ovitrap sites
>4 LIRAa
<4 LIRAa
Regions
North
South
East
West
Center
B
VT rate: 67%
VT rate: 40%
VT rate: 100%
VT rate: 0%
VT rate: 75%
Infected pools
DENV
ZIKV
CHIKV
DENV + CHIKV
North
South
East
West
Center

C

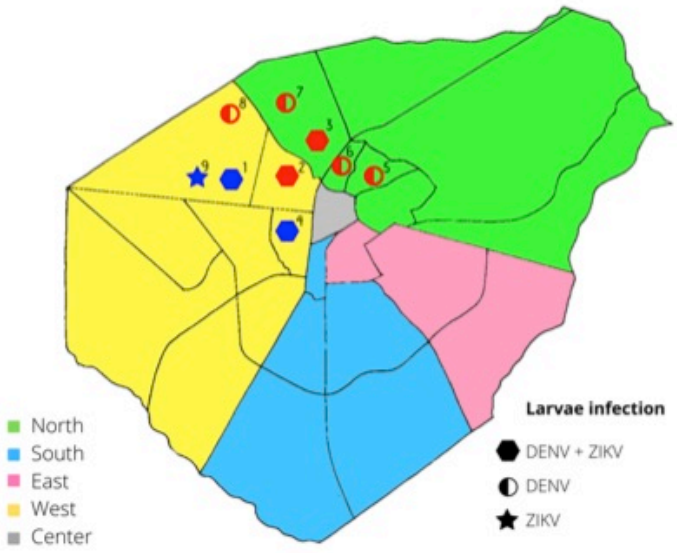
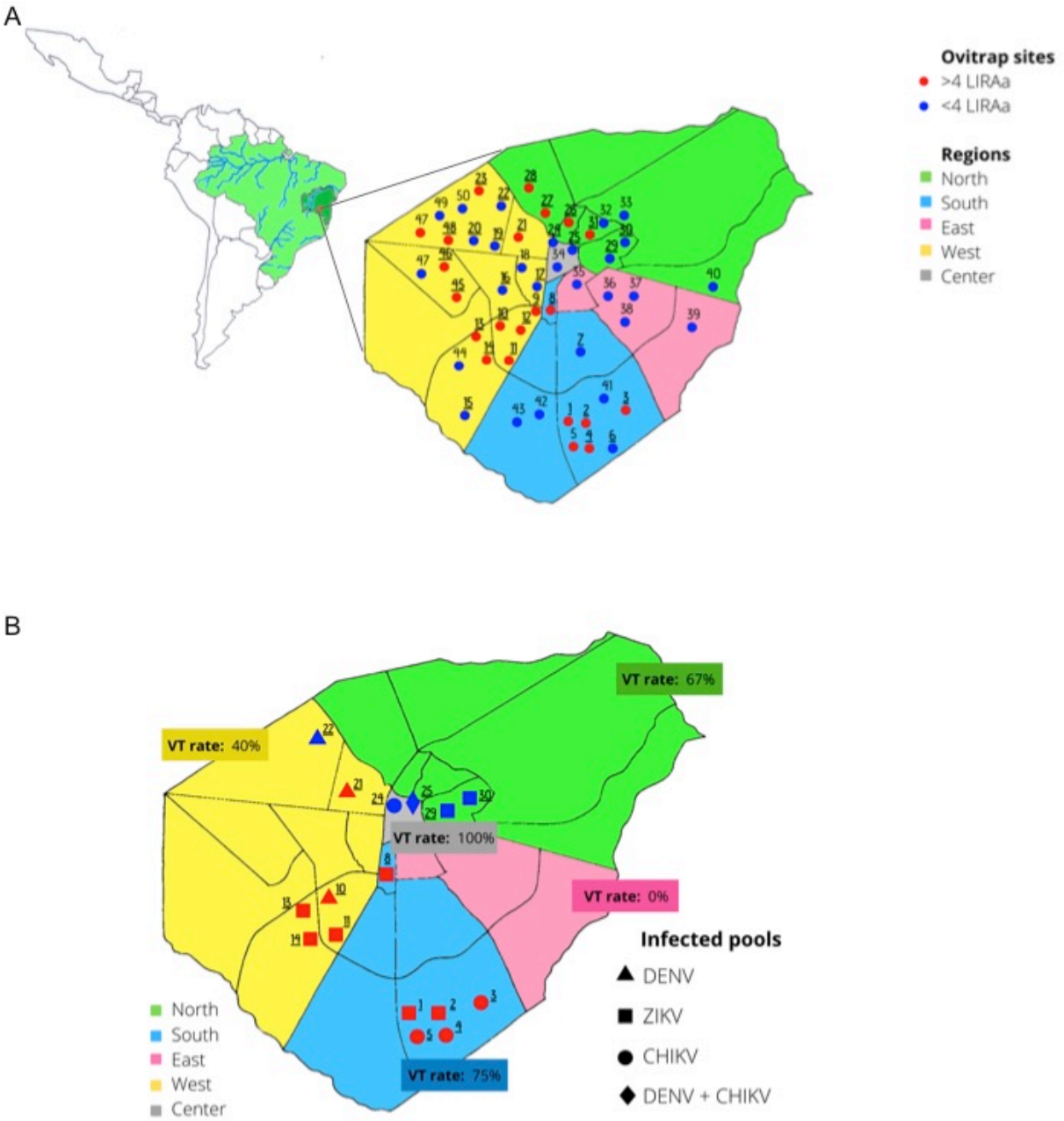

North
South
East
West
Center
Larvae infection
DENV + ZIKV
DENV
ZIKV

FIGURE 1 (color should be used for this figure in print)



C

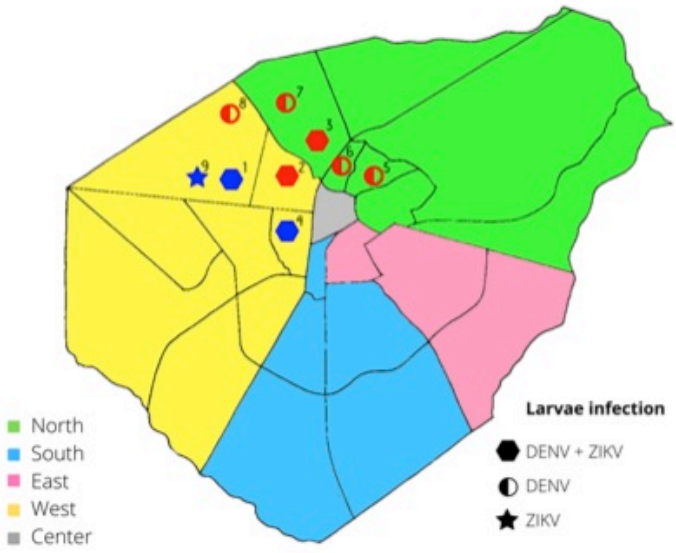


Figure 1 - Ovitraps location and arboviruses detection. A- Map of Brazil (left side) showing the geographic localization of the Vitória da Conquista City in the Northeastern region. The city is divided into five health administrative regionals according to their geographic position (right side). The colored spots are showing the distribution of 50 ovitraps. The red and blue spots are ovitraps that presented infestation indexes above and bellow 4, respectively. The spots whose numbers are underlined represent the ovitraps that provided viable larvae. **B-** Map of the city showing 53.3% of infected ovitraps for DENV (▲) , ZIKV (■), CHIKV (●), and DENV + CHIKV (♦). The VT rates are presented for each administrative regionals. **C-** Distribution of individually analyzed larvae that were positive for arboviruses. DENV: Dengue virus; ZIKV: Zika virus; CHIKV: Chikungunya virus.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As três principais arboviroses do Brasil estão presentes de forma endêmica em Vitória da Conquista. O estudo documentou, por meio do monitoramento de larvas, a circulação de DENV, ZIKV e CHIKV de forma simultânea no município de Vitória da Conquista. Até o presente momento ainda não foram publicados estudos que comprovem a cocirculação desses três vírus através da transmissão vertical.

A distribuição dos três vírus encontra-se de forma heterogênea entre regiões avaliadas, pois as diferentes regiões apresentaram índices de positividade discrepantes nas amostras. Esse dado pode ser utilizado pelos gestores de saúde para planejamento de intervenções nas regiões mais acometidas. Além disso, o estudo provou que no contexto local o escore do LIRAa possui associação com a presença destas arboviroses e a transmissão vertical, respaldando mais ainda o uso do LIRAa para tomada decisões.

É interessante ressaltar que o vírus com maior presença nas amostras foi o ZIKV seguido de CHIKV, dado que contrasta com o número de casos confirmados do município de Vitória da Conquista. Como foi descrito anteriormente, a arbovirose com maior número de casos confirmados é a Dengue. Primeiramente, deve-se considerar que o estudo não foi desenhado com o intuito de identificar a arbovirose com maior risco de casos no município e, portanto, a amostra pode não ser representativa para este objetivo. Por outro lado, a discrepância entre os dados confirmados e o número de larvas positivas para ZIKV e CHIKV permitem questionar a subnotificação dos casos e dificuldade de diagnóstico diferencial entre estas arboviroses.

Inúmeros estudos têm sido realizados para avaliar a interação desses diferentes patógenos na mesma área geográfica. A avaliação das larvas de forma individual trouxe dados ainda não publicados na literatura. A transmissão vertical de forma simultânea de ZIKV e DENV foi um achado inédito. Outro dado relevante é que as larvas coinfectadas possuíam um maior número de cópias para o ZIKV. Esta informação pode ajudar a compreender fenômenos epidemiológicos.

Desta forma, os achados apresentados trazem informações relevantes para a compreensão do comportamento das arboviroses.

ANEXO 1

Manuscripts submitted to Journal of Medical Entomology

OXFORD UNIVERSITY PRESS | Journal of Medical Entomology

Simultaneous circulation of Zika, Dengue, and Chikungunya and vertical co-transmission to Aedes aegypti

Journal:	*Journal of Medical Entomology*
Manuscript ID	JME-2020-0351
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	06-Aug-2020
Complete List of Authors:	Teixeira, Adriano; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira de Brito, Breno; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira Correia, Thiago; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira Viana , Airton ; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira Carvalho , Juliana ; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira da Silva, Filipe Antônio ; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira Santos, Maria Luísa; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira da Silveira, Eliezer; Secretaria Municipal de Saúde de Vitória da Conquista, Setor de Controle de Endemias Neto , Henry Paul; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira da Silva, Natalia Maria; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira Rocha , Cínthya ; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira Pinheiro , Fillipe ; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira Chaves, Barbara; Fundacao de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Instituto de Pesquisas Clínicas Carlos Borborema; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical Monteiro, Wuelton; Fundacao de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Gerência de Entomologia; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical Lacerda , Marcus; Fundacao de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Gerência de Malária Secundino, Nagila ; Fundação Oswaldo Cruz Instituto René Rachou, Laboratory of Medical Entomology Pimenta, Paulo; Fundacao Oswaldo Cruz, Laboratory of Medical Entomology Melo, Fabrício ; Universidade Federal da Bahia Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira