

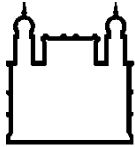
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Vigilância e Controle
de Vetores

**ESTUDO DA ECOLOGIA DAS POPULAÇÕES DE ESPÉCIES DE
Haemagogus (DIPTERA: CULICIDAE), NA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL
DO SANA, MACAÉ, ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

PAULO JOSÉ LEITE

Rio de Janeiro
Outubro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Vigilância e Controle de Vetores

PAULO JOSÉ LEITE

Estudo da ecologia das populações de espécies de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae), na Área de Proteção Ambiental do Sana, Macaé, estado do Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Vigilância e Controle de Vetores.

Orientador: Prof. Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2020

Leite, Paulo José.

Estudo da ecologia das populações de espécies de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae), na Área de Proteção Ambiental do Sana, Macaé, estado do Rio de Janeiro/ Paulo José Leite. - Rio de Janeiro, 2020.

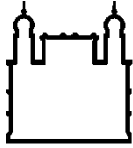
76 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 2020.

Orientador: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar.

Bibliografia: f. 56-62

1. Culicidae. 2. ovos. 3. *Haemagogus leucocelaenus* . 4. abundância relativa. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Vigilância e Controle de Vetores

AUTOR: PAULO JOSÉ LEITE

ESTUDO DA ECOLOGIA DAS POPULAÇÕES DE ESPÉCIES DE *Haemagogus* (DIPTERA: CULICIDAE), NA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO SANA, MACAÉ, ESTADO DO RIO DE JANEIRO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar

Aprovada em: 29 /10/ 2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Teresa Fernandes Silva do Nascimento- **Presidente** - IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Ronaldo Figueiró Portella Pereira / UEZO

Prof. Dr^a. Nildimar Honório Rocha - IOC/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Renata Campos Azevedo - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet- IOC/FIOCRUZ


Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2020




Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Vigilância e Controle de Vetores de **Paulo José Leite**, sob orientação do Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar. Ao vigésimo nono dia do mês de outubro de dois mil e vinte, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Levantamento e estudo da ecologia das populações de espécies de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae), na Área de Proteção Ambiental do Sana, Macaé, estado do Rio de Janeiro, atualmente incluída entre as áreas com incidência do vírus amarelo**", no programa de Pós-graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia de vetores e interação parasito-hospedeiro, na linha de pesquisa: Taxonomia A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Teresa Fernandes Silva do Nascimento – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Ronaldo Figueiro Portella Pereira– UEZO/RJ, Dr^a. Nildimar Honório Rocha – IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Renata Campos Azevedo- UFRJ/RJ e Dr^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet - IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovado da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Fernando Ariel Genta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2020.


Dr^a. Teresa Fernandes Silva do Nascimento (Presidente da Banca):


Dr. Fernando Ariel Genta (Coordenador do Programa):



Dedicatória

A Deus por me amar e permitir essa realização.

Aos meus pais, José Leite (*in memoriam*) e Cléa Maria Leite (*in memoriam*) que sempre me ensinaram que o caminho para vitória é constituído por honestidade, humildade e muito trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar** pela dedicada orientação, pela liberdade dada em todas as etapas deste trabalho e por ter feito de tudo para que eu pudesse concluir esta pesquisa da melhor forma possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Coordenador do curso de Mestrado Profissional em Vigilância e Controle de Vetores, Dr. Fernando Ariel Genta, pelo apoio, atenção, incentivo e compreensão nas horas boas e difíceis.

Ao chefe do Laboratório de Diptera/IOC, Prof. Anthony Érico Guimarães.

À secretária do curso de Mestrado Profissional em Vigilância e Controle de Vetores, Helenice Andrade que sempre se mostrou presente e prestativa em todos os momentos do decorrer do curso.

A todos os professores do curso, que dedicaram com muito respeito, profissionalismo e compartilhamento de conhecimentos em favor do nosso aprendizado, colaborando muito com nossa formação.

Aos companheiros do Laboratório de Diptera/IOC-FIOCRUZ: **Dra. Michele Serdeiro, Profa. Amanda Queiroz Bastos**, Dra. Júlia dos Santos Silva, Profa. Danielle de Farias, Profa. Shayenne Olsson Silva, Profa. Cecilia Ferreira de Mello, Prof. Alexandre Araújo, Prof. Jean Jules, Prof. Juan Augusto dos Campos e a aluna de biologia Luana Lima de Souza.

Ao Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira e a todos os companheiros do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários / IOC-Fiocruz.

À Prof^a Dr^a. Teresa Fernandes Silva do Nascimento, pela importante contribuição, enriquecendo com valiosas sugestões a redação final do texto.

Aos maravilhosos e encantadores colegas da turma do Mestrado Profissional em Vigilância e Controle de Vetores 2018, que sempre se mostraram presentes dentro e fora de sala, sempre dispostos a contribuir e ajudar. São eles: Adriana Mainenti (Drica), Elaine Mendonça de Rio Bonito, Flavio Quadra, o Bom mineiro carioca, Gilliarde Caetano, José Carlos Nogueira (Zecão), José de Arimatéa do Malaco, Milton Araújo (Miltão), Osvaldo Damasceno de Santarém, Priscila Serravale do *Anopheles*, Rose Barreto de Teixeira, Sebastião Clebson (Seba), Sheila Ventura de Paraty, Tatiana Barbosa, mineira de Macapá, Micheli Xavier de Piraí, Viviane Nunes, Vivi de Niterói. Éta turma boa!

Aos companheiros de caminhada: Antônio Ferreira de Santana (Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera/IOC-FIOCRUZ), Ezequias Fagundes (SMS São João de Meriti. RJ), Wellington Santos Silva (SMS Japeri. RJ), Célia Soares (SMS Queimados RJ), Dr. William Marques (Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera/IOC-FIOCRUZ)

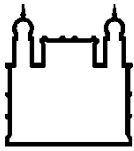
Ao colega Wagner Passos do Laboratório de Parasitologia Fiocruz

Aos colegas do município de Macaé-RJ: Biólogo Alexandre Bezerra do Parque Atalaia e sua competente equipe.

À minha família pelo total apoio e paciência nas horas de ausência e nas ausências presente.

Aos colegas de trabalho da Suvam de Nova Iguaçu: Sebastião Loures de Miranda, José Romero de Oliveira, Andréa Pereira, Marco Venício S. Barros, Maria de Fatima de Moura, Maria de Fatima de Oliveira, Soni Tavares, Leticia Leal e Gutemberg Gusmão.

Ao Sr. Carlos Augusto Rodrigues – Superintendente da Suvam em Nova Iguaçu - RJ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DA ECOLOGIA DAS POPULAÇÕES DE ESPÉCIE DE *Haemagogus* (DIPTERA: CULICIDAE), NA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO SANA, MACAÉ, ESTADO DO RIO DE JANEIRO

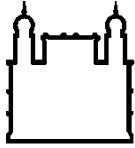
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM VIGILÂNCIA E CONTROLE DE VETORES

Paulo José Leite

O presente trabalho teve como objetivo analisar os padrões sazonais de distribuição e abundância relativa de *Haemagogus leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 em um fragmento de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, no qual ocorre atualmente a circulação do vírus da Febre Amarela (FA). As amostragens foram realizadas em três diferentes sítios na Área de Proteção Ambiental do Sana (APAS), Macaé, RJ, Brasil. Para coleta contínua de ovos instalou-se 15 armadilhas de oviposição (ovitrampas), colocadas em árvores a 2,50 metros de altura, numeradas em sequência e monitoradas entre outubro de 2016 a abril de 2018. Durante o período de amostragem obteve-se 13.419 ovos de Culicidae, abrangendo três espécies pertencentes a dois gêneros: *Aedes terreus*, *Haemagogus leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*. *Hg. leucocelaenus* apresentou maior abundância em todos os sítios amostrais estudados. O índice de densidade de ovos permitiu detectar flutuações temporais da população reprodutivamente ativa de culicídeos, registrando-se o maior índice no período chuvoso. Entretanto, considerando isoladamente a totalidade dos ovos coletados no período mais chuvoso e mais seco foi de apenas 5.4%. Verificou-se que houve uma diferença significativa entre os dados de ovos eclodidos no período seco e no período chuvoso, conforme os resultados obtidos a partir do teste de Mann-Whitney, o qual apresentou p-valor < 0,05. A correlação dos fatores abióticos foi significativa para *Hg. leucocelaenus* em relação à precipitação pluviométrica e em relação à temperatura, não apresentando, contudo, correlação com a umidade relativa do ar. Considerando que a região estudada apresenta condições propícias para a transmissão do vírus causador da Febre Amarela Silvestre, e tendo em vista a forte presença de espécimes dos principais vetores do vírus no Brasil, faz-se necessária atenção especial à vigilância para o surgimento de doenças febris entre moradores das áreas do entorno ou ainda na população local, a fim de esclarecer o diagnóstico correto, e a possível ocorrência do vírus da Febre Amarela.

Palavras – chaves: Culicidae, ovos, *Haemagogus leucocelaenus*, abundância relativa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF THE ECOLOGY OF THE POPULATIONS OF SPECIES OF *Haemagogus* (DIPTERA: CULICIDAE), IN THE AREA OF ENVIRONMENTAL PROTECTION OF SANA, MACAÉ, STATE OF RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN SURVEILLANCE AND VECTOR CONTROL

Paulo José Leite

The aim of the present study was to analyze the seasonal patterns of distribution, evaluate the relative abundance, and observe the hatching rate of *Haemagogus leucocelaenus* eggs, collected from the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, an area with circulation of the yellow fever virus. A total of fifteen ovitraps were distributed, with five ovitraps placed at each different sampling point at random distances between them. They were installed in trees, 2.50 meters high in a forest environment, and were sequentially numbered, monitored, and replaced every two weeks from October 2016 to April 2018. During the sampling period, 13,419 Culicidae eggs were collected; these belonged to three species and two genera: *Aedes terrens*, *Haemagogus leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 and *Hg. janthinomys*. The abundance of *Hg. leucocelaenus* eggs was greater than that of the other species in all the collection sites. The egg density index allowed the detection of temporal fluctuations in the active reproductive population of culicids, registering the highest values in the rainy season. However, the difference in hatched eggs between the rainy and the dry season was only 5.4%. The results of a Mann-Whitney test ($p < 0,05$) showed a very significant difference between the total eggs that hatched in the dry and the rainy period. *Haemagogus leucocelaenus* was correlated significantly with certain abiotic factors, such as pluviometric precipitation and temperature; the species was not, however, significantly correlated with relative humidity. Considering that the studied region has favorable conditions for the transmission of the yellow fever virus and in view of the strong presence of specimens of the main vectors of the virus in Brazil, the surveillance of the emergence of febrile illnesses among the residents of the surrounding areas or even in the local population, in order to obtain a correct diagnosis and verify the possible occurrence of yellow fever, is mandatory.

Key – words: Culicidae, eggs, *Haemagogus leucocelaenus*, relative abundance

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Breve histórico da febre amarela	18
1.1.1 Epidemiologia	20
1.1.2 Febre Amarela no Estado do Rio de Janeiro	23
1.2 Família Culicidae e generalidades	28
1.2.1 Classificação.....	28
1.2.2 Ciclo de vida	31
1.2.3 Bioecologia do gênero <i>Haemagogus</i>	35
1.3 Justificativa	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Declaração ética	39
3.2 Área de estudo	39
3.3 Coletas	40
3.4 Acondicionamento e criação	42
3.5 Identificação dos espécimes	42
3.6 Análise ecológica	42
3.7 Dados meteorológicos	43
4 RESULTADOS	44
5 DISCUSSÃO	50
6 PERSPECTIVAS	54
7 CONCLUSÕES	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9 APÊNDICE	63

APÊNDICE - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA O MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.....	64
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Regiões endêmicas Febre Amarela no mundo.	21
Figura 2:	Ciclos epidemiológicos da Febre Amarela.	21
Figura 3:	Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> .	22
Figura 4:	<i>Haemagogus janthinomys</i>	22
Figura 5:	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	23
Figura 6:	Distancia da área de estudo para o primeiro caso de Febre Amarela em Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro.	24
Figura 7:	Distribuição dos casos de Febre Amarela no município de Macaé, estado do Rio de Janeiro.	25
Figura 8:	Mapa com a distribuição de epizootias no estado do Rio de Janeiro de Janeiro a março/2017.	26
Figura 9:	Distribuição de epizootias no estado do Rio de Janeiro.	27
Figura 10:	Ciclo de vida de mosquitos do gênero <i>Culex</i> .	31
Figura 11:	Diferenças morfológicas existentes entre machos e fêmeas adultos de Culicidae. Fêmea - Antena pilosa; Macho - Antena plumosa.	32
Figura 12:	Ovos de Culicidae: (A) Ovo de <i>Culex</i> ; (B) Ovo de <i>Aedes</i> e (C) Ovo de <i>Anophele</i> .	33
Figura 13:	Larvas de <i>Ae. aegypti</i> . Podemos observar cabeça, tórax e abdome, além do sifão respiratório	34
Figura 14:	Exúvia de uma larva de quarto estágio ao lado a pupa do <i>Ae. aegypti</i> .	35
Figura 15:	Oco de árvore, sítio natural de ovoposição de mosquitos do gênero <i>Haemagogus</i> .	36
Figura 16:	Área de Proteção do Sana.	40
Figura 17:	Composição da armadilha ovitrampa.	41
Figura 18:	Confecção manual das armadilhas do tipo ovitrampa	41
Figura 19:	Análise comparativa do número de ovos de Culicídeos eclodidos coletados durante o período seco e período chuvoso coletados na Área de Proteção Ambiental de Sana, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil, de outubro de 2016 a abril de 2018.	45
Figura 20:	Diferença entre o número de ovos de Culicídeos eclodidos coletados durante o período seco dos locais de coleta 1, 2 e 3, na Área de Proteção Ambiental de Sana, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil	45

- Figura 21:** Comparação do número de ovos de Culicídeos eclodidos coletados nos Pontos 1, 2 e 3 durante a estação chuvosa na Área de Proteção Ambiental do Sana, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil **46**
- Figura 22:** Dados de temperatura (temperatura mínima e temperatura máxima) e valor absoluto de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* coletados na Área de Proteção Ambiental do Sana, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil, de outubro de 2016 a abril de 2018. **47**
- Figura 23:** Chuva (mm) e valor absoluto de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* coletados na Área de Proteção Ambiental do Sana, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018. **48**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Subfamílias, tribos, gêneros, subgêneros, número de espécies e distribuição de Culicidae 29
- Tabela 2:** Abundância de ovos de Culicidae coletados durante o período seco e chuvoso na área de Proteção de SANA, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018 44
- Tabela 3:** Abundância de ovos de Culicidae coletados durante o período seco e chuvoso na área de Proteção de SANA, município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018 46
- Tabela 4:** Correlação de Spearman entre a densidade de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* e os fatores abióticos (temperatura, precipitação e umidade relativa do ar) coletados na Área de Proteção Ambiental do SANA, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018 48
- Tabela 5:** Casos notificados para Febre Amarela no Município de Casimiro de Abreu e Macaé, estado do Rio de Janeiro 49
- Tabela 6:** Distribuição dos casos confirmados de Febre Amarela Silvestre no município de Macaé, estado do Rio de Janeiro 49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APA - Área de Proteção Ambiental

APAS - Área de Proteção Ambiental do Sana

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CHIKV - Vírus Chikungunya

FA - Febre amarela

FAS - Febre Amarela Silvestre

FAU - Febre Amarela Urbana

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IDO -Índice de densidade de ovos

IPO - Índice de positividade de ovitrampa

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MS - Ministério da Saúde

POP Procedimento Operacional Padrão

PNHS- Primatas Não-Humanos

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

REGUA - Reserva Ecológica de Guapiaçu (Município de Cachoeiras de Macacu estado do Rio de Janeiro).

Rebio do Tinguá - Reserva Biológica do Tinguá (Município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro)

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

Suam- Superintendência de Vigilância Ambiental em Saúde

TE – Taxa de eclosão

VFA - Vírus da Febre Amarela

1 INTRODUÇÃO

A Febre Amarela (FA) é uma doença não contagiosa, infecciosa febril aguda, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae. A doença mantém-se endêmica e enzoótica em diversas regiões tropicais das Américas e da África e, de modo esporádico, são registrados surtos e epidemias de magnitude variável (Brasil, 2009). A febre amarela ocorre principalmente no continente africano, onde se tem registros de mais de 90% dos registros de casos, já nas Américas tem-se registrado casos da doença no Equador, Venezuela, Peru, Bolívia e no Brasil (Albuquerque, 2007; Vasconcelos & Monath, 2016).

Os principais gêneros, que incluem espécies competentes para se infectar e transmitir o vírus da febre amarela são *Haemagogus* Williston, 1896 e *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827 que atuam como vetores biológicos nas áreas de florestas das Américas. Recentemente estudos com o objetivo de mapear áreas de surto de febre amarela e seus possíveis vetores, detectaram pela primeira vez o *Aedes taeniorhynchus* infectado, o qual, juntamente com *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) e *Sabethes chloropterus* (von Humboldt, 1891), parece exercer um papel de vetor local ou secundário (Abreu et al., 2019). *Haemagogus* apresenta grande diversidade, sendo constituído de 28 espécies (Marcondes & Alencar, 2010) e algumas de elevada importância epidemiológica na transmissão do vírus da Febre Amarela Silvestre (FAS) (Arnell, 1973).

No Brasil o vírus da Febre Amarela vem sendo identificado de norte a sul, com a ocorrência de epizootias cíclicas, casos humanos e com isolamento deste vírus em mosquitos do gênero *Haemagogus*, como: *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 e *Haemagogus leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 (Mondet et al., 2002; Costa, 2005; Araújo et al., 2011; Abreu et al., 2019). Embora o aporte de conhecimentos sobre a Febre Amarela seja amplo, ainda existem lacunas a serem compreendidas sobre o comportamento dos principais vetores biológicos, agente etiológico, assim como, seus hospedeiros no que se refere ao entendimento da latência do vírus durante o período inter-epidêmico (Dégallier et al., 1986). Em decorrência dessa realidade, o conhecimento da diversidade de Culicidae em fragmentos de Mata Atlântica é muito importante para avaliações das mudanças no padrão das atividades de suas populações, até então considerados como de hábito preferencialmente silvestre.

O recente registro de casos humanos por Febre Amarela na região sudeste do Brasil, principalmente no estado do Rio de Janeiro, estimulou a realização de estudos mais aprofundados em relação aos hábitos e comportamento dos vetores silvestre dessa arbovirose (Couto-Lima et al., 2017). O presente estudo se propõe a estudar vários aspectos da biologia das espécies de *Haemagogus* das áreas de situação de vigilância entomológica para FAS, como: variação de acordo com as condições ambientais (temperatura, pluviosidade, umidade relativa do ar).

O sistema de Vigilância para a Febre Amarela Silvestre esteia-se em diferentes eixos envolvendo acompanhamento de casos humanos, análise das epizootias e implementação de campanhas de vacinação.

Os casos ocorrem frequentemente em regiões com inexistência ou baixa cobertura vacinal. Apesar da adoção dessas estratégias em áreas vulneráveis de FAS, observa-se uma incapacidade de cessar a transmissão do vírus amarelíco entre primatas humanos (Brasil, 2010). A partir desse paradigma de incertezas em relação a essa doença veiculada por vetores, surge um novo desafio para a comunidade científica: avançar em novas tecnologias e conhecimentos que sirvam de incremento para um novo modelo eficiente na avaliação de risco de patógenos transmitidos por mosquitos vetores.

1.1 Breve histórico da Febre Amarela no Brasil

A Febre Amarela é uma arbovirose de grande importância no continente americano, com a maioria dos casos ocorrendo no Brasil.

Proveniente do continente africano, esta arbovirose foi introduzida em nosso continente com os navios de escravos, que traziam não só o vírus, mas também o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), que se desenvolvia com facilidade nos tonéis de água armazenada para o consumo, durante as viagens. A partir daí, difundiu-se do norte dos Estados Unidos até o Cone Sul (Vasconcelos, 2003; Clements & Harbach, 2017).

De acordo com Franco (1969):

“Béranger -Féraud (1890), que estudou profundamente o assunto, confirmou que na realidade a febre amarela não foi observada na antiguidade e provavelmente não foi descrito por Hipócrates no seu livro das epidemias. Durante a segunda expedição de Cristóvão Colombo, no ano de 1495, os espanhóis travaram contra os indígenas a batalha de Vega-Real ou Santo Serro, na ilha Espanhola do Haiti. Alguns historiadores relatam que tantos os nativos quanto espanhóis refugiaram-se nas florestas e nas montanhas e após dois meses daquela batalha, ocorreu uma epidemia, tanto entre os europeus como entre os indígenas, fazendo numerosas vítimas em ambas as partes. Os sintomas descritos, embora incompletos, e a elevada mortalidade, permitiram a Béranger-Féraud chegar à conclusão de que se pode admitir sem hesitação que esta doença era Febre Amarela. A partir destas observações foram aparecendo notas, resenhas, histórias e monografias parecidas umas às outras, descrevendo uma “praga epidêmica” existente no Novo Mundo, sem nenhuma semelhança com as enfermidades conhecidas na Europa. Existem várias teorias sobre a origem da Febre Amarela. Em 1686, foi admitida sua procedência africana, sendo assim as colônias francesas receberam instruções para que fossem tomadas providências sanitárias, para evitar a infecção amarílica procedente da África.”

A Febre Amarela causou grande mortandade em numerosas cidades, de Filadélfia a Buenos Aires, transmitida por *Ae. aegypti* (Spielman D'Antonio, 2001).

O Brasil sofreu muito com a doença, em termos sanitários e econômicos, e a sua eliminação das zonas urbanas, no início do século XX, foi um grande feito (Silva, 2003).

Em nosso país, a primeira epidemia de FA ocorreu no ano de 1685 em Recife e em outras cidades do Estado de Pernambuco. No ano seguinte, surgiu um grande surto em Salvador, Estado da Bahia (Franco, 1969). Após um período de silêncio, que durou um pouco mais de um século, a FA reapareceu em Salvador em 1849, alastrando-se para diversas cidades litorâneas e atingiu a Província do Rio de Janeiro, quando morreram 4.160 pessoas (Franco, 1969). Entre 1850 a 1899, a doença se propagou pelo país levando a ocorrência de epidemias em quase todas as províncias do Império, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (Brasil, 2001). Por muitos anos acreditou-se que a febre amarela era transmitida através de miasmas. De longo tempo em países

atingidos por epidemias amarílicas foi observado que havia alguma correlação entre aqueles surtos e os mosquitos. Em 1881, Carlos Finlay incriminou o mosquito *Stegomyia fasciata*, atualmente conhecido como *Aedes aegypti*, como vetor da FA. A descoberta desencadeou muitas campanhas contra o mosquito nos países onde a FA era um problema de saúde pública (Franco 1969).

Na década de 1920, surgiu a suspeita de transmissão em áreas florestais da Colômbia, e esta foi comprovada no vale de Canaã, no estado do Espírito Santo, ficando evidente que o vírus havia se adaptado a mosquitos silvestres. Os reservatórios mais evidentes são os bugios e os macacos-prego que parecem ser resistentes. Os gambás podem ser reservatórios, mas raramente têm sido analisados (Mondet 2002). Em 1938, pesquisadores conseguiram associar o mosquito *Haemagogus* com a transmissão da febre amarela silvestre (Franco 1969).

O desenvolvimento de uma vacina eficiente auxiliou muito na prevenção da ocorrência da doença. No entanto, como a população potencialmente exposta é muito grande e flutuante, já que o vírus ocorre em quase todos os estados do Brasil, o controle da doença é muito complexo. A aplicação universal da vacina levaria ao risco desnecessário de reações adversas.

1.1.1 Epidemiologia

A Febre Amarela (FA) é uma arbovirose endêmica ou enzoótica existente nas florestas tropicais da América e África (Figura 1) causando surtos isolados ou epidemias, com grande impacto na saúde pública. Esta doença possui dois ciclos, sendo eles: um ciclo silvestre (FAS) e outro urbano (FAU) (Figura 2), ambos com a mesma sintomatologia, e mudando apenas os transmissores e hospedeiros vertebrados (Hervé et al. 1986). O ciclo urbano é simples, feito por homem-mosquito, onde o mosquito *Ae. aegypti* (Figura 3) é o vetor do vírus, não necessitando de hospedeiros amplificadores. No Brasil, não há registro do ciclo urbano da febre amarela desde 1942, sendo os últimos casos notificados no estado do Acre (Brasil 2001).

Já o ciclo silvestre é mais complexo, pois várias espécies de mosquitos são responsáveis por essa transmissão. Este ciclo se faz quando os mosquitos realizam o repasto sanguíneo nos primatas não humanos infectados, geralmente pertencentes ao gênero *Cebus*, *Alouatta* ou *Callithrix*. Esses mosquitos se contaminam e picam o

homem, sendo este homem, hospedeiro acidental (Brasil 2009).



Figura 1. Regiões endêmicas Febre Amarela na América do Sul.
Fonte: <https://www.cdc.gov/yellowfever/>. Acesso em 10/08/2020.

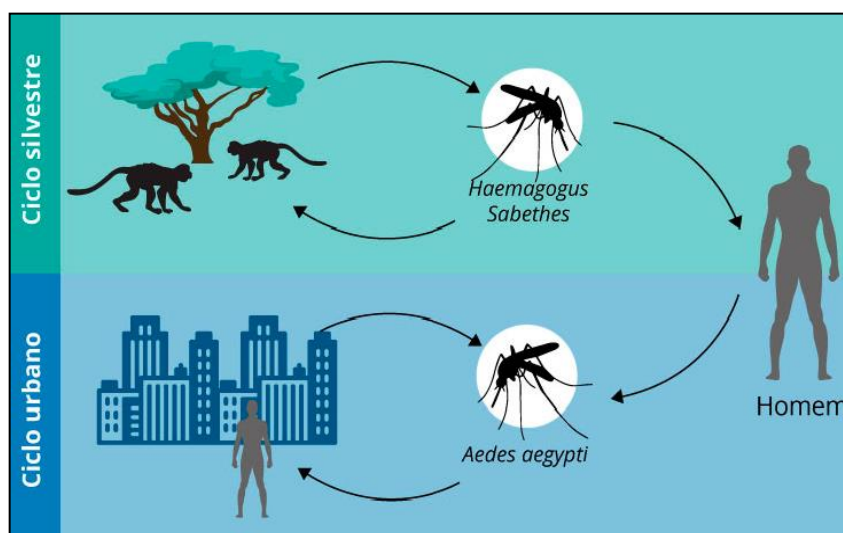


Figura 2. Ciclos epidemiológicos da febre amarela.
Fonte: Ministério da Saúde. 2009.



Figura 3. *Aedes aegypti*.

Fonte: Genilton José Vieira. Lab. Produção e Tratamento de Imagens. Fiocruz. RJ.

Várias espécies de mosquitos têm sido encontradas naturalmente infectadas com o vírus da FA, em diferentes regiões do Brasil: *Psorophora ferox*, no interior de São Paulo, *Aedes serratus* no Rio Grande do Sul, *Aedes scapularis* e *Aedes taeniorhynchus*, mais recentemente em estados do sudeste. Todos considerados vetores secundários ou locais da FAS (Cardoso et al., 2010; Moreno et al., 2011; Abreu et al., 2019). Entretanto, a maioria dos isolamentos virais para FA vem sendo feita em *Hg. janthinomys* e *Hg. leucocelaenus*, podendo dizer assim que hoje eles são os principais vetores do vírus da Febre Amarela Silvestre no Brasil (Costa et al., 2005; Abreu et al., 2019) (Figuras 4 e 5). Espécies de *Sabethes* que também são assinaladas como vetores, estão presentes nos mesmos habitats dos *Haemagogus*, porém elas não são consideradas bons vetores, pois não possuem uma capacidade de adaptação em áreas com ações antrópicas (Camargo-Neves et al., 2005).



Moustique / Mosquito *Haemagogus janthinomys*
Alto Paraiso, GO; photo N. Degallier, IRD, 2001

Figura 4. *Haemagogus janthinomys*



Figura 5. *Haemagogus leucocelaenus*.

Foto de Genilton José Vieira. Lab. Produção e Tratamento de Imagens. Fiocruz. RJ.

Os riscos de contrair a doença são maiores para aquelas pessoas que se expõem à mata, aos que evitam as incursões em matas ou que vivem em áreas indenes da virose esse percentual é muito baixo. A vacinação é a medida profilática mais eficiente para combater esta doença, pois todas as pessoas não vacinadas e que se exponham às picadas dos transmissores infectados pelo vírus em áreas de floresta, ou em áreas em que o vírus da febre amarela existe, podem se infectar e adoecer pela FA (Vasconcelos, 2000).

É desconhecido se há maior suscetibilidade do vírus da febre amarela de acordo com a etnia, cor ou faixa etária (Brés, 1986). Entretanto, estudos revelaram que a faixa etária de maior ocorrência varia entre 14 e 35 anos. Essa preferência ocorre pela maior exposição às matas e não pela maior susceptibilidade ao vírus (Vasconcelos, 2000).

Os mosquitos são considerados transmissores e reservatório do vírus, pois além de transmitir o vírus, uma vez infectados, eles permanecem com o vírus a vida toda. Já os primatas humanos e não humanos, ficam doentes, morrem ou conseguem se curar, ficando imunes a esse vírus. Deste modo, os macacos atuam como hospedeiros amplificadores da virose (Vasconcelos, 2000).

1.1.2 Febre amarela no Estado do Rio de Janeiro

No Brasil, a FAS ocorre de forma enzootica/endêmica na região Amazônica e na região extra-amazônica há registros de períodos epidêmicos ocasionais, o que caracteriza a reemergência do vírus no país.

No período 2014-2015, a transmissão que inicialmente ocorreu na região norte, expandiu-se de leste para sul, afetando principalmente os estados da região centro-

oeste em 2015-2016. A partir da reemergência na região Centro-Oeste, o vírus expandiu-se pelo território brasileiro, atingindo áreas com baixas coberturas vacinais e onde a vacinação não era recomendada (Brasil, 2017).

-1º ciclo

Depois de um grande período de silêncio da Febre Amarela, mais recentemente, entre 2016/2017, o Brasil registrou o surto mais expressivo da doença, que afetou principalmente os estados da região Sudeste, quando foram registrados 779 casos humanos e 262 óbitos, além de 1.659 epizootias por FA (Brasil, 2018). O mais alarmante é que a epidemia em curso se espalhou progressivamente para a costa atlântica, causando mortes de PNHs e humanos em uma zona livre de febre amarela por mais de 70 anos, mas altamente infestada por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Brasil, 2017). No estado do Rio de Janeiro, em março de 2017 foram registradas as primeiras notificações de casos humanos de Febre Amarela, todos detectados no município de Casimiro de Abreu, na região noroeste do estado, distante cerca de 12,5 km da nossa área de estudo que fica no município de Macaé, região norte do estado do Rio de Janeiro (Figura 6).

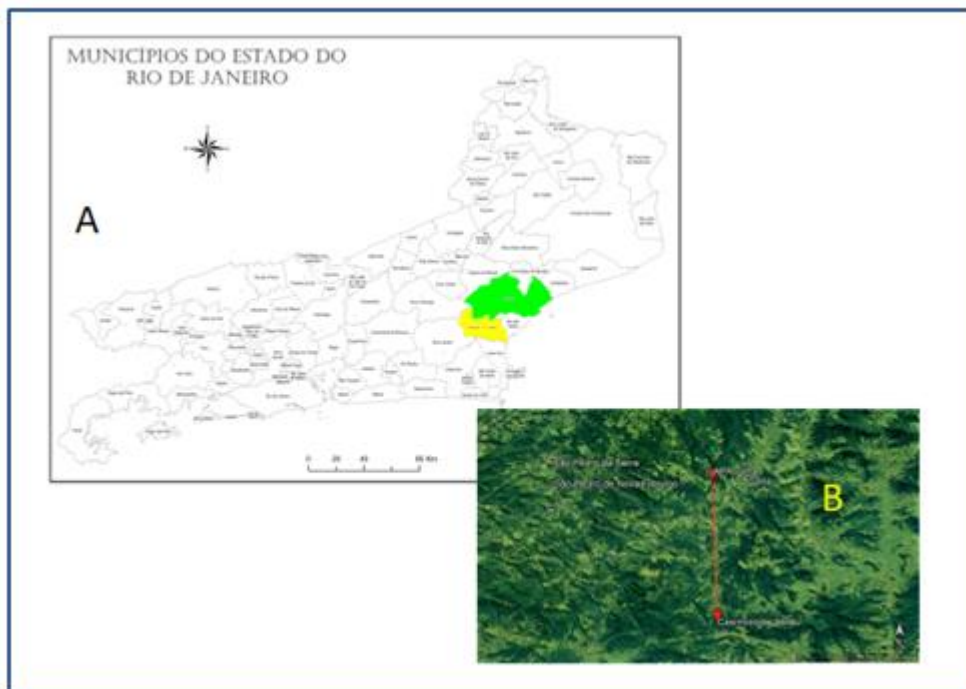


Figura 6. (A), Mapa dos municípios do estado Rio de Janeiro com destaque para Macaé e Casimiro de Abreu, (B) Distância de 12,5 Km da área de estudo na APA do Sana para o primeiro caso de FAS em Casimiro de Abreu no estado do Rio de Janeiro em março de 2017.

Fonte: IBGE e Google Earth , acesso em 17 de outubro de 2020, montado pelo autor.

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde, no primeiro ciclo da doença que ocorreu entre os períodos de julho de 2016 a junho de 2017, foram notificados 83 casos humanos, onde 28 foram confirmados. Dos 28 casos confirmados, nove evoluíram a óbito com uma letalidade 32,1%. Os nove casos que evoluíram para óbito, ocorreram nos seguintes Municípios: dois em Porciúncula; dois em Macaé; um em Casimiro de Abreu; um em Maricá; um em Silva Jardim; um em Santa Maria Madalena e um em Nova Friburgo. Em Macaé foram confirmados 5 casos de febre amarela (Figura 7).

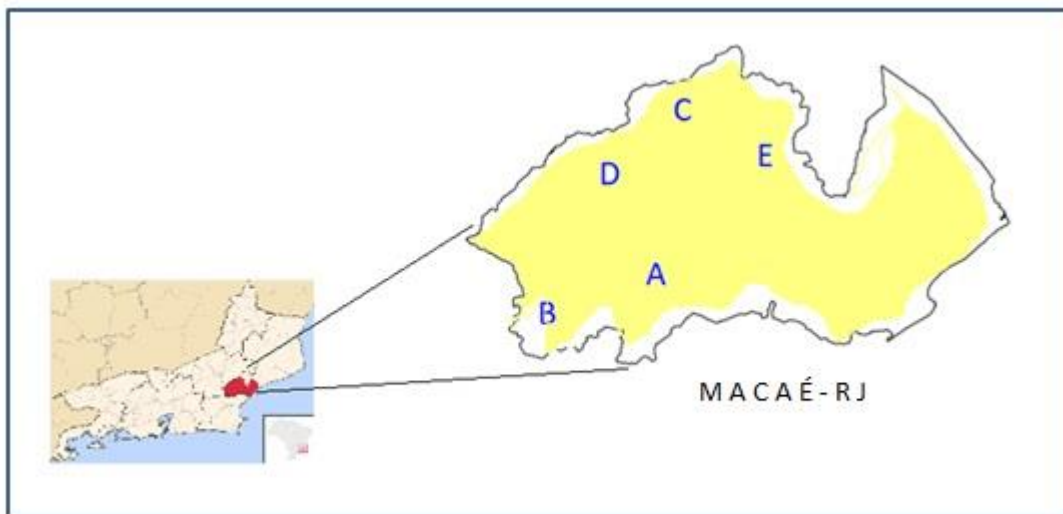


Figura 7. Distribuição dos casos de Febre Amarela nos bairros do município de Macaé, estado do Rio de Janeiro: (A) Areia Branca (Óbito), (B) Sana, (C) Trapiche (D) Glicério (Óbito) e (E) Córrego do Ouro. Fonte : IBGE / Wikipédia, montado pelo autor.

Os casos notificados possuem média e mediana de idade 39 e 35 respectivamente, sendo 65% (N=54) do sexo masculino e 35% (N=29) do sexo feminino. Nesse 1ª ciclo foram notificadas cerca de 216 epizootias envolvendo cerca de 362 animais. Em sete Municípios foram confirmadas essas epizootias: Campos dos Goytacazes; Carmo; Maricá; Santa Maria Madalena, São Sebastião do Alto, Guapimirim e Macuco (Figura 8).

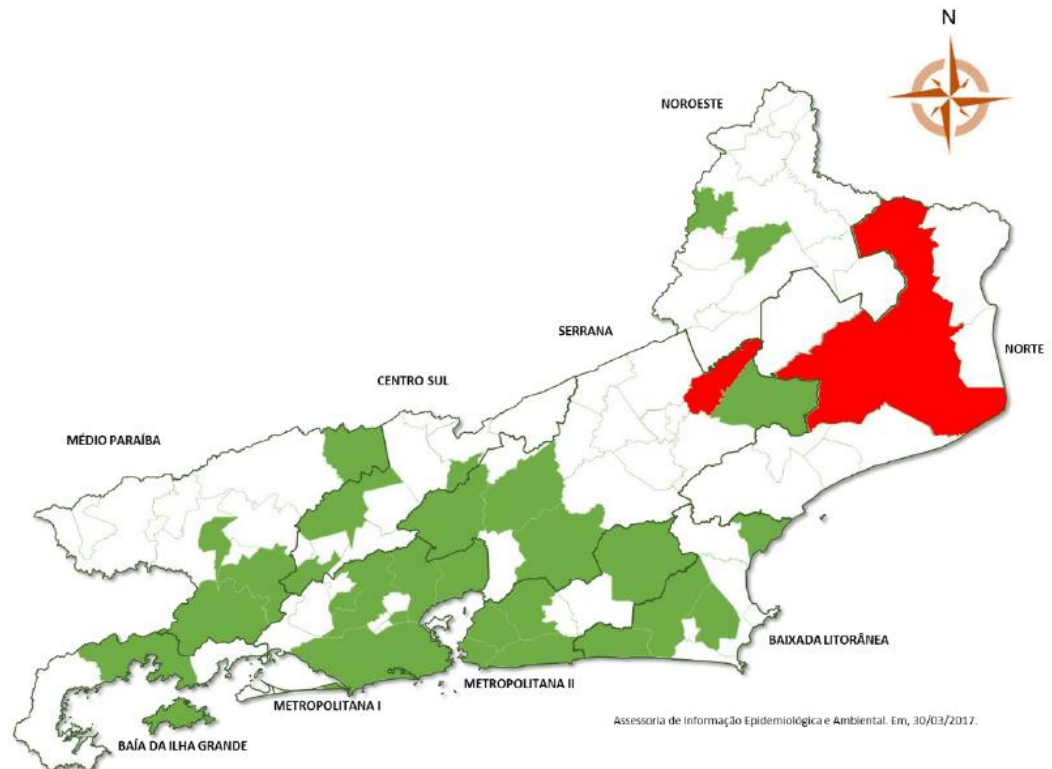
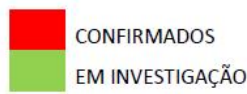


Figura 8. Mapa com a distribuição de epizootias no Estado do Rio de Janeiro de Janeiro a março/2017 (Fonte: CIEVS/SVEA/SES-RJ).

-2º ciclo

No segundo ciclo monitoramento (julho/2017 a junho/2018) dos casos de Febre Amarela no Estado do Rio de Janeiro, percebe-se, através dos boletins epidemiológicos, o caminhar do vírus para região central e sul do estado, fato que já sinalizava este caminho de acordo com a epizootia progressiva no primeiro ciclo de monitoramento da doença. O nosso monitoramento vetorial se limita até a semana epidemiológica 17 de acordo com o período do nosso estudo.

Segundo informações da Secretaria Estadual de Saúde (SES) do Rio de Janeiro, entre julho de 2017 a maio de 2018, registrou-se 476 notificações de casos suspeitos de FA, destes, foram confirmados 255 casos, dos quais 91 evoluíram para óbito.

. Neste período, não houve registro de casos de febre amarela nas cidades de Macaé e Casimiro de Abreu. No entanto, o município de Nova Friburgo confirmou nove casos com cinco óbitos e Silva Jardim registrou três confirmações com dois óbitos. Dos casos de FAS confirmados, 79% (n=201) são do sexo masculino e apenas 21% (n=52)

1.2 Família Culicidae & Generalidades

Acredita-se que a família Culicidae tenha surgido no período do Jurássico, assim como, no Cretáceo tenha sido registrado o primeiro fóssil, que trata-se do táxon *Burmaculex antiquus* Borken & Grimaldi 2004, descrito a partir de um exemplar fêmea descoberto em Myanmar (antiga Birmânia) em 1999, dentro de um âmbar fossilizado (FIOCRUZ / INVIVO 2020). Os mosquitos (em senso estrito) são insetos perfeitamente adaptados à antroposfera. São também conhecidos popularmente como pernilongos, carapanãs e muriçocas.

Desde a antiguidade estão envolvidos com a transmissão de agentes patogênicos ao homem e a outros animais que conosco convive. Incontáveis são as citações na literatura histórica e científica, dando conta de sua estreita associação com a humanidade.

Mendez (1984) referiu registros dessa “convivência” já entre os anos 2000-1500 a. C. na Mesopotâmia, China, Índia e Egito.

1.2.1 Classificação

Os mosquitos são dípteros nematóceros, pertencentes à família Culicidae. Em sua forma adulta se distinguem dos demais integrantes da ordem Diptera por apresentarem escamas nas veias alares, caráter que não se encontra nem nas famílias mais próximas, Chaoboridae e Dixidae (Forattini, 2002).

São dípteros, ou seja, insetos que possuem um par de asas, como as moscas, mas sua característica principal é que as fêmeas têm as peças bucais alongadas, adaptadas para picar e sugar o sangue de animais vertebrados (Forattini, 2002). Atualmente a família Culicidae está dividida em duas subfamílias e existem 3549 espécies de mosquitos reconhecidas e distribuídas em aproximadamente 112 gêneros (Harbach, 2008) ou 42 gêneros de acordo com a classificação mais tradicional de Wilkerson et al. (2015). Ocorrem em todas as regiões do planeta, constituindo grupo taxonômico de relevante biodiversidade (Tabela 1).

Tabela 1. Subfamílias, tribos, gêneros, subgêneros, número de espécies e distribuição de Culicidae (Harbach, 2007).

Subfamília Tribo	Gênero	Nº de Subgênero s	Nº de espécie s	Distribuição
Anophelinae	<i>Anopheles</i>	7	455	Cosmopolita
	<i>Bironella</i>	3	8	Australásia
	<i>Chagasia</i>	0	4	Neotropical
Culicinae				
Aedeomyiini	<i>Aedeomyia</i>	2	6	Afrotropical, Australásia, Oriental, Neotropical
Aedini	<i>Aedes</i>	23	363	Velho Mundo, Neártica
	<i>Armigeres</i>	2	58	Australásia, Oriental
	<i>Ayurakitia</i>	0	2	Oriental
	<i>Borichinda</i>	0	1	Oriental
	<i>Eretmapodites</i>	0	48	Afrotropical
	<i>Haemagogus</i>	2	28	Principalmente Neotropical
	<i>Heizmannia</i>	2	39	Oriental
	<i>Ochlerotatus</i>	22	550	Cosmopolita
	<i>Opifex</i>	0	1	Nova Zelândia
	<i>Psorophora</i>	3	48	Novo Mundo
	<i>Udaya</i>	0	3	Oriental
	<i>Verrallina</i>	3	95	Principalmente Australásia, Oriental
	<i>Zeugnomyia</i>	0	4	Oriental
Culicini	<i>Culex</i>	23	763	Cosmopolita
	<i>Deinocerites</i>	0	18	Principalmente Neotropical
	<i>Galindomyia</i>	0	1	Neotropical
	<i>Lutzia</i>	3	7	Afrotropical, Australásia, Oriental, Neotropical, Paleártico Oriental.
Culisetini	<i>Culiseta</i>	7	37	Velho Mundo, Neártica
Ficalbiini	<i>Ficalbia</i>	0	8	Afrotropical, Oriental
	<i>Mimomyia</i>	3	44	Afrotropical, Australásia, Oriental
Hodgesiini	<i>Hodgesia</i>	0	11	Afrotropical, Australásia, Oriental
Mansoniini	<i>Coquillettia</i>	3	57	Velho Mundo, Neotropical
	<i>Mansonia</i>	2	23	Velho Mundo, Neotropical
Orthopodomyiini	<i>Orthopodomyia</i>	0	38	Afrotropical, Neártica, Neotropical, Oriental Paleártico
Sabethini	<i>Isostomyia</i>	0	4	Neotropical
	<i>Johnbelkinia</i>	0	3	Neotropical
	<i>Kimia</i>	0	5	Oriental
	<i>Limatus</i>	0	8	Neotropical
	<i>Malaya</i>	0	12	Afrotropical, Australásia, Oriental
	<i>Maorigoeldia</i>	0	1	Nova Zelândia
	<i>Onirion</i>	0	7	Neotropical
	<i>Runchomyia</i>	2	7	Neotropical
	<i>Sabethes</i>	5	38	Neotropical
	<i>Shannoniana</i>	0	3	Neotropical
	<i>Topomyia</i>	2	54	Principalmente Oriental
	<i>Trichoprosopon</i>	0	13	Neotropical
	<i>Tripteroides</i>	5	122	Principalmente Australásia, Oriental
	<i>Wyeomyia</i>	15	140	Principalmente Neotropical, Afrotropical, Australásia, Neotropical
Toxorhynchitini	<i>Toxorhynchites</i>	4	88	Paleártica Oriental, Oriental
Uranotaeniini	<i>Uranotaenia</i>	2	265	Afrotropical, Australásia, Orietal, Neotropical

A subfamília Anophelinae Grassi, 1900 reúne três gêneros: *Anopheles* Meigen, 1818, *Chagasia* Cruz, 1906 e *Bironella* Theobald, 1905, sendo os dois primeiros encontrados na região Neotropical (região que compreende a América do Sul, o Caribe e parte da América Central). Dentre eles, *Anopheles* se destaca por incluir as espécies responsáveis pela transmissão da malária. A subfamília Culicinae Meigen, 1818, formada por 11 tribos, nove delas também encontradas na região Neotropical, reúne diversas espécies com interesse epidemiológico, principalmente das tribos Aedini Neveu-Lemaire, 1902 e Culicini Meigen, 1818 (Forattini, 2002). Os culicíneos podem ser diferenciados dos anofelinos de acordo com diversas características como: os ovos são postos separadamente em locais úmidos, fora do meio líquido como no caso dos *Aedes* spp. ou em conjunto para as espécies do gênero *Culex* e no caso de *Anopheles* são depositados isoladamente na superfície da água ou perto dela e possuem flutuadores (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Outras diferenças morfológicas dos adultos entre as duas subfamílias estão relacionadas ao tamanho dos palpos maxilares, que nas fêmeas de Culicinae são mais curtos que a probóscide e nas fêmeas de Anophelinae são tão longas quanto essa estrutura. Ambas subfamílias podem ainda se diferenciar pelo formato do escutelo, trilobado nos Anophelinae e arredondado nos Culicinae.

1.2.2 Ciclo de vida

Os mosquitos são insetos holometábolos, isto é, durante o seu ciclo de vida passam pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 10).

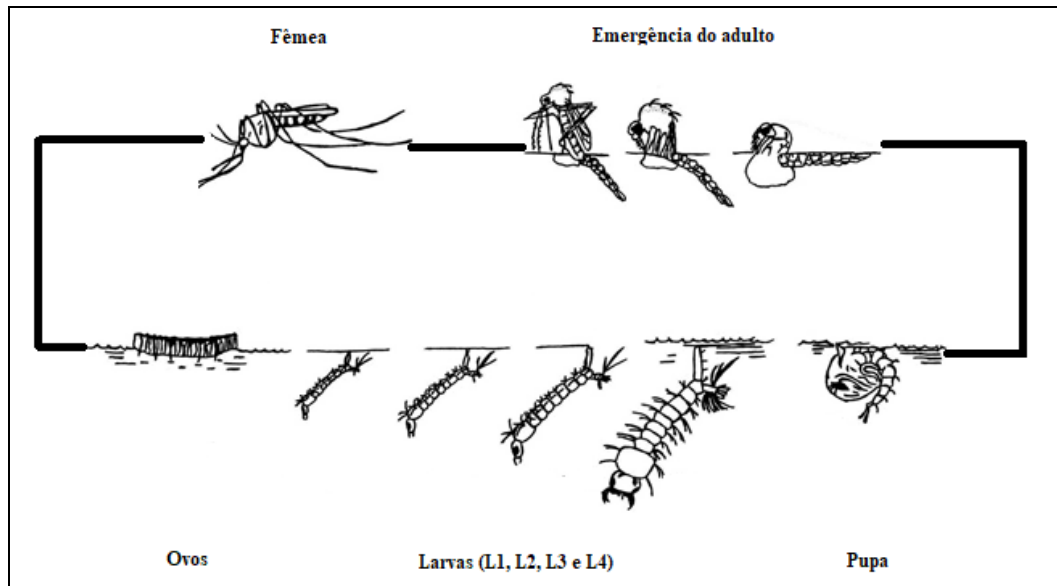


Figura 10. Ciclo de vida de mosquitos do gênero *Culex*. Adaptado de <http://www.wumcd.org/mosquito/lifecycle.html>. Acesso: 27 de junho de 2020.

-Adultos

Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A cabeça possui um par de antenas, dois olhos compostos, um par de palpos maxilares e o aparelho bucal picador-sugador denominado probóscide. O tórax é formado por três segmentos, onde em cada um deles encontra-se um par de pernas e no 2º seguimento um par de asas e um par de halteres. O abdome é constituído por 8 segmentos e mais dois reduzidos e modificados para reprodução (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A forma de dimorfismo sexual mais comum está nas antenas (Figura 11). Os segmentos flagelares antenares são revestidos por cerdas, em geral mais longas e numerosas nos machos, por isso chamadas de antenas “plumosas”, e mais curtos e menos numerosos nas das fêmeas, antenas “pilosas”.

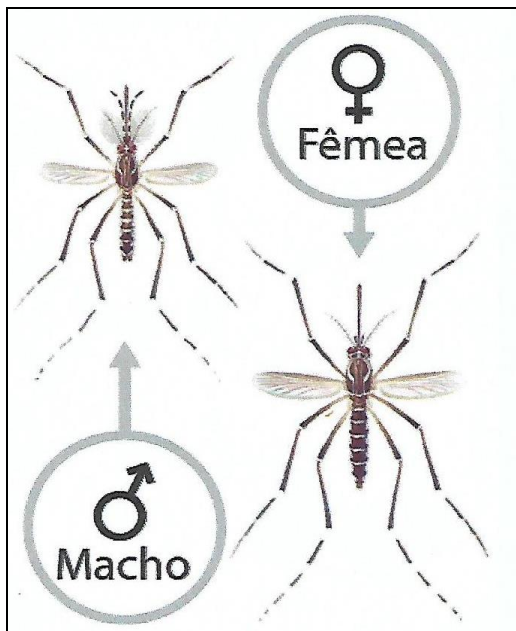


Figura 11. Diferenças morfológicas existentes entre machos e fêmeas adultos de Culicidae. (A) Fêmea - Antena pilosa; Macho - Antena plumosa (Fonte: Pro Epi 2018).

Com relação ao tamanho, geralmente as fêmeas são maiores que os machos, mas em geral possuem de 3-6 mm de comprimento. Em mosquitos como *Toxorhynchites* Theobald, 1901 e *Psorophora ciliata* Fabricius, 1794 que tem porte avantajado, as fêmeas podem chegar a 19 mm. Em qualquer caso, a distinção entre os sexos através das genitálias não deixa dúvidas.

Na grande maioria as fêmeas de mosquitos são hematófagas. No entanto, algumas espécies de mosquitos, como os pertencentes ao gênero *Toxorhynchites*, as fêmeas são fitófagas, portanto, dependem exclusivamente da alimentação com carboidratos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Quanto à preferência alimentar sanguínea, algumas espécies são zoófilas estritas, ou seja, só picam os animais; outras são antropofílicas e ainda existem aquelas que são generalistas, podendo picar tanto o homem quanto os animais.

- Ovos

Após o repasto sanguíneo, as fêmeas grávidas realizam a oviposição nos criadouros, que variam de espécie para espécie. Podem ser permanentes ou temporários, naturais ou artificiais e, ainda, no solo ou em recipientes (Neves, 2011). Os mais comuns incluem corpos de água naturais tais como remansos de rios, lagoas,

poças temporárias, buracos de árvores e internódios de bambu, ou artificiais como latas, caixas d'água e pneus velhos (Neves, 2011).

Os ovos podem ser depositados pelas fêmeas unidos sobre a água, formando conjuntos denominados “jangadas”, como no gênero *Culex* Linnaeus, 1758 (Figura 12A), ou depositados separadamente e fora d'água, como por exemplo ovos postos pelas fêmeas de *Aedes* Meigen, 1818 (Figura 12B), ou ainda isolados sobre a água, a exemplo das espécies do gênero *Anopheles* Meigen, 1818 (Figuras 12C). Os ovos de Anophelinae possuem expansões laterais no cório chamados flutuadores, cuja função já é definida pelo sua própria denominação (Forattini, 2002).



Figura 12. Ovos de Culicidae: (A) Ovo de *Culex*, (B) Ovo de *Aedes* e (C) Ovo de *Anopheles* (Fonte: Pro Epi, 2018).

O número de ovo é variável para cada espécie, mas usualmente uma fêmea ovipõe de 70 a 120 ovos por postura, variando de duas a oito posturas por fêmea (Neves, 2011).

Os ovos são de formato oval ou elíptico, mais ou menos alongado e dotados de simetria bilateral. Geralmente tornam-se escurecidos ou pretos pouco tempo após a postura, o revestimento dos ovos é formado pelo cório, este compõe-se de duas camadas, uma externa, o exocório e outra interna, o endocório. (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). O exocório apresenta relevos e estruturas que têm se revelado de grande auxílio na sistemática, mas que para visualização apropriada necessitam de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na extremidade anterior do ovo há um pequeno orifício, a micrópila, pela qual o espermatozoide penetra (Forattini, 2002)

-Larvas

Após um tempo em contato com a água, os ovos irão liberar pequenas formas imaturas, as larvas. As larvas passam por quatro estádios de desenvolvimento,

designados por instares (L1, L2, L3 e L4) até se transformarem em pupa (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

As larvas dos mosquitos têm o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome. Não têm apêndices locomotores; por não terem pernas são chamadas de ápodes. Sempre vivem em meio aquático com mobilidade ativa graças à execução de movimentos irregulares de contorção. Alimentam-se constantemente de microorganismos (ex. zooplânctons, fitoplânctons e matéria orgânica suspensa) (Forattini, 2002).

A cabeça e o tórax são arredondados, globulares, enquanto o abdome é mais alongado. No corpo da larva inserem-se mais de 200 pares de cerdas, cujo aspecto e tamanho é de grande importância na identificação. A quetotaxia é o estudo da distribuição e denominação dessas cerdas, a terminologia empregada para as cerdas segue uma lógica da posição em que a mesma se insere. Assim, usa-se uma letra do local em que a cerda se insere seguida do seu número. Por exemplo, 2-C é a segunda cerda da cabeça, 2-III, a segunda cerda do terceiro segmento abdominal. No segmento VIII do abdome, além de cinco pares de cerdas, existe um conjunto lateral de escamas: a escova ou pente do segmento VIII (Forattini,1996).

Quanto ao posicionamento na água para a respiração, as larvas de anofelinos permanecem paralelamente à superfície líquida e não apresenta sifão respiratório, apenas um aparato onde os espiráculos se abrem na superfície enquanto que as larvas de culicíneos (*Culex* e *Aedes*) têm um tubo (sifão) para respirar, apresentando uma posição oblíqua quando estão junto à superfície da água (Figura 13) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).



Figura 13. Larvas de *Ae. aegypti*. Podemos observar cabeça, tórax e abdome, além do sifão respiratório. Foto de Genilton Vieira – Lab. de Prod.Trat.de Imagens. Fiocruz. RJ

-Pupa

As pupas não se alimentam, e é nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio pupal para mosquito adulto. Essa fase geralmente dura de 2 a 3 dias (Forattini, 2002). A pupa é dividida em cefalotórax e abdome, ou seja, a cabeça e o tórax são unidos constituindo o cefalotórax, o que dá a pupa em uma visão lateral a forma de vírgula. Movimenta-se com rapidez e para respirar é dotada de um par de respiradores ou trompetas respiratórias e seu deslocamento é facilitado através de palhetas natatórias, localizadas no final do abdome (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994) (Figura 14).



Figura 14. Exúvia de uma larva de quarto estágio ao lado a pupa do *Ae. aegypti*. Foto de Genilton Vieira- Lab.Prod.Trat.de Imagens. Fiocruz.RJ

1.2.3 Bioecologia do gênero *Haemagogus*

Pertencentes à subfamília Culicinae, dentro da tribo Aedini se encontram os mosquitos do gênero *Haemagogus*, os quais são silvestres, de hábitos diurnos e desenvolvem suas atividades na copa das árvores. Algumas espécies desse gênero mostram tendência à domiciliação e várias espécies são importantes vetores de vírus de FAS (Marcondes & Alencar, 2010).

Estão distribuídos principalmente na América Central e norte da América do Sul, mas algumas espécies têm sido obtidas nos Estados Unidos, norte do México e Argentina (Marcondes & Alencar, 2010).

No Brasil, *Hg. janthinomys* é encontrado da Amazônia ao Sudeste, notadamente até Minas Gerais, enquanto *Hg. leucocelaenus*, se estende de Norte a Sul (Forattini, 2002). Como os demais mosquitos, as espécies de *Haemagogus* podem ser

influenciados pelas condições climáticas, como: temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade (Teixeira et al. 1999), o que conseqüentemente tem um efeito direto na emergência ou reemergência de doenças infecciosas transmitidas por vetores (Anyamba et al., 2014).

Dégallier et al. (2006) observaram que as epizootias e epidemias ocorridas na Amazônia foram associadas ao início da estação chuvosa, quando as densidades de mosquitos são mais altas, acompanhando o incremento do regime pluviométrico da floresta.

Os ovos de *Haemagogus leucocelaenus*, que resistem por longo tempo antes da eclosão, são colocados isoladamente no substrato úmido de recipientes naturais e eclodem na época mais chuvosa do ano. Os ovos de *Aedini* parecem ter respostas diferentes aos estímulos externos para eclosão, mas alguns ovos podem precisar de mais de uma imersão para a eclosão (Clements, 1963). Isto é conhecido como “instalment hatching” (Gillett, 1955), e provavelmente é uma estratégia para a sobrevivência dos mosquitos em criadouros temporários submetidos a várias inundações (Andreadis, 1990).

Os criadouros de *Haemagogus* na sua maioria são representados por ambientes naturais como ocos de árvores, internódios de bambus, cascas de coco, bromélias, dentre outros (Figura 15) (Arnell, 1973).

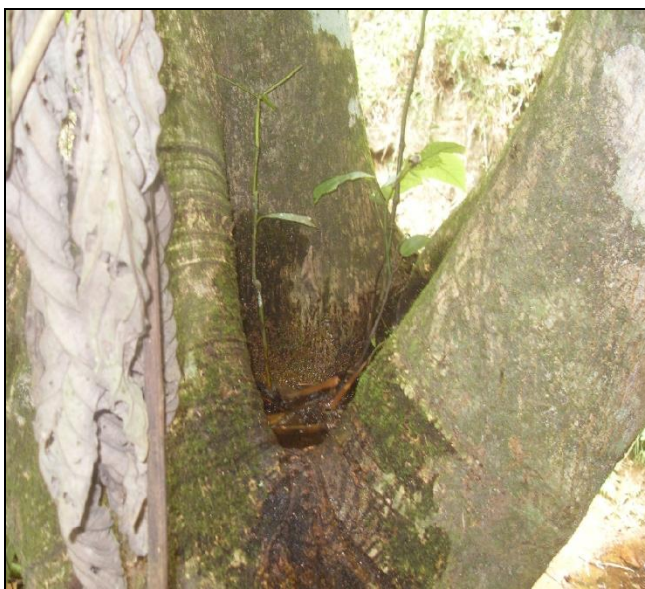


Figura 15. Oco de árvore, sitio natural de ovoposição de mosquitos do gênero *Haemagogus*.
Fonte: Paulo Leite. Laboratório de Diptera. IOC. Fiocruz. RJ

1.3 Justificativa

As florestas tropicais contêm tanto a maior parte da diversidade quanto os maiores hiatos no conhecimento da sua fauna (Lamarre et al., 2012). O Brasil, país com alta biodiversidade, sofre, contudo, uma preocupante aniquilação de ambientes, com táxons sendo extintos antes que possam ser descobertos ou descritos pela ciência, tornando premente a necessidade de ampliação dos inventários faunísticos, incluindo levantamentos da entomofauna culicidiana. A compreensão sobre os aspectos ecológicos e biológicos das populações de Culicidae realizados em ambiente natural proporcionam informações sobre a relação entre a diversidade de espécies e a área nas quais são encontradas, considerando que mosquitos silvestres podem vir a se tornar potenciais vetores de patógenos, e contribuem com subsídios para o entendimento de importantes aspectos epidemiológicos. Escolhemos para o desenvolvimento desse estudo, a Área de Proteção Ambiental do Sana, no município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, justamente pelo fato de apresentar um desenho epidemiológico sugestivo, composto por um vale de montanhas, com rica fauna e flora, além de inúmeras cachoeiras e pelo fato de estar inserido em área de Mata Atlântica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar aspectos da biologia das espécies de *Haemagogus*, relacionadas principalmente às variações das condições ambientais, das áreas de situação de vigilância entomológica para Febre Amarela Silvestre.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as espécies de mosquitos coletados em fragmentos de Mata Atlântica em situação de vigilância, devido à proximidade de áreas com ocorrência de FAS na Área de Proteção Ambiental do Sana no Estado do Rio de Janeiro.
- Analisar a distribuição da oviposição em relação a diferentes sítios amostrais utilizados pelas fêmeas de *Haemagogus*.
- Comparar a ovoposição nos períodos seco e chuvoso
- Correlacionar as variações climáticas (temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade) com a densidade populacional das espécies de *Haemagogus* nos diferentes pontos amostrais.
- Descrever as características epidemiológicas dos casos humanos confirmados de febre amarela silvestre que ocorreram na Área de Proteção Ambiental do Sana e na circunvizinhança.
- Elaborar no Laboratório de Díptera do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, fontes de informações biológicas sobre as espécies de mosquitos do gênero *Haemagogus*: confeccionando um guia de manutenção adequado e estocagem de ovos, eclosão larvária, manutenção das larvas e pupas, e criação até o estágio de adulto, gerando um manual com distintos Procedimentos Operacional Padrão (POP) para ser aplicado em Laboratório de entomologia. O produto direcionará de forma objetiva a prática de rotinas, com o objetivo de atender à demanda de espécimes utilizados em ensaios biológicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

A licença permanente de coleta, captura e transporte de material biológico foi concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - (SISBIO) - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) com o número: 34911-1. Todos os membros da equipe foram devidamente vacinados contra a Febre Amarela.

3.2 Área de Estudo

Considerado um santuário ecológico, com dezenas de cachoeiras em uma área de Mata Atlântica localizado em vale cercado de montanhas, a Área de Preservação Ambiental do Sana, localizada no município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil, foi criada 2001, pela Lei Municipal 2172. A criação da APA do Sana teve como objetivos promover o desenvolvimento sustentável a partir dos recursos naturais, além de preservar e proteger a flora e a fauna, além das belezas naturais como: cachoeiras, elevações rochosas, vegetação e ordenar o processo de ocupação. A APA se estende por uma área de 15,7 hectares, e a Mata Atlântica existente é do tipo secundária de onde surgem a grande atração da região que são as cachoeiras. A APA do Sana é uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável dos Recursos Ambientais e engloba toda extensão do distrito. (PMM,2020)

A Bacia do Rio Sana, presente na maior parte do território da APAS, é a maior e mais importante fonte de água do Rio Macaé (PMM, 2019). Em cada ponto amostral sob as mesmas condições de altura (2,5m) e quantidade (5 unidades por ponto) instalou-se as armadilhas de ovitrampas:

Ponto de coleta 1 (22°20'01.3"S, 042°12'24.0"W): apresenta densa camada arbustiva, com árvores altas muito próximas umas das outras; Ponto de coleta 2 (22°20'02.9"S, 042°12'28.3"W): localizado às margens do Rio Sana. A fauna de mosquitos nesse ponto recebe influência da fisionomia vegetal com a presença de bambuzais; Ponto de coleta 3 (22°20'02.9"S, 042°12'31.1"W): tem a cobertura vegetal semelhante ao ponto amostral 1, no entanto, em mata mais preservada além do rio está localizado mais próximo a esse ponto amostral (Figura 16).

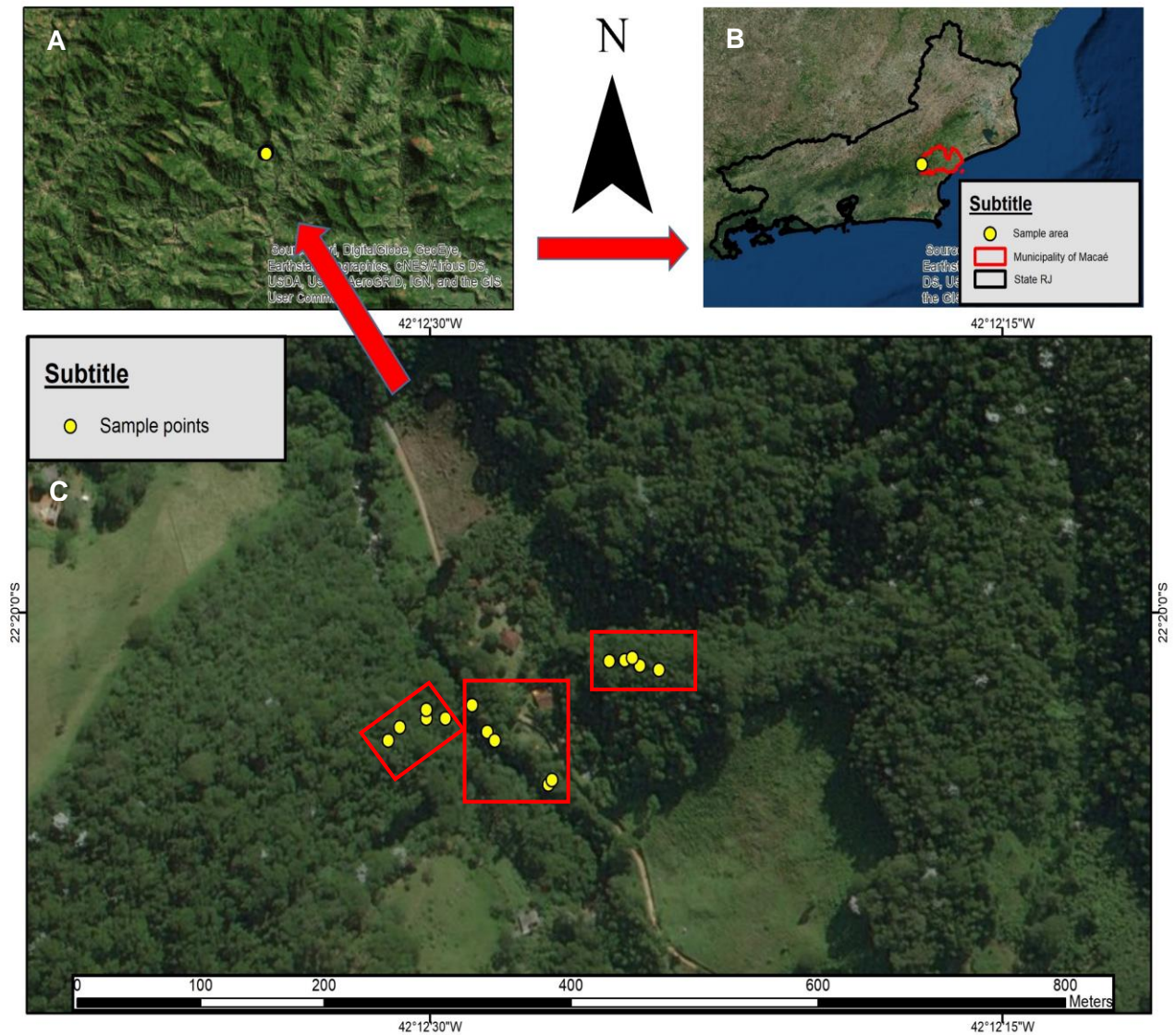


Figura 16. Área Proteção Ambiental do Sana. A: Localização do ponto de coleta dentro da reserva. B: Localização da reserva dentro do município de Macaé no estado do Rio de Janeiro, Brasil. C: Localização dos pontos amostrais contendo três blocos amostrais com cinco pontos marcados em amarelo.

3.3 Coletas

Para coletas de ovos utilizaram-se de armadilhas do tipo ovitrampas constituídas por pote preto fosco, com capacidade para o volume de 500 mL, sem tampa com quatro palhetas de madeira compensada (placas de Eucatex), de 4 cm X 14 cm, presas verticalmente no interior da armadilha por “CLIPS” (Figura 17).

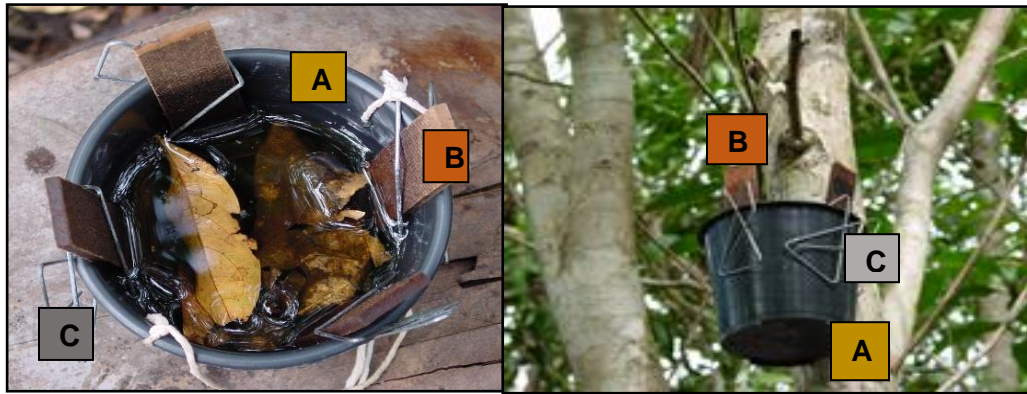


Figura 17. Composição da armadilha ovitrapa: vaso (A), palheta (B) e “CLIPS” (C) (grampo de metal) Fonte: Jeronimo Alencar. Laboratório de Diptera. IOC. Fiocruz .RJ

Na ovitrapa, foi adicionada água natural e serrapilheira (restos de folhas e material orgânico em decomposição do solo), visando reproduzir um microecossistema mais próximo do natural. Distribuíram-se aleatoriamente quinze armadilhas de ovitrapas, sendo cinco ovitrapas em cada ponto de amostragem, instaladas em árvores a 2,50 metros de altura em ambiente florestal com numeração sequencial, monitoradas e substituídas quinzenalmente de outubro de 2016 a abril de 2018 (Figura 18) (Silver, 2008; Alencar et al. 2016).



Figura 18: A- Confeção manual das armadilhas do tipo ovitrapa. B e C instalação das armadilhas na altura de 2,5 metros.

3.4 Acondicionamento e criação

Após o recolhimento das ovitrampas, a cada 15 dias, as mesmas foram acondicionadas em uma caixa de polietileno e enviadas identificação no Laboratório de Diptera do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. No laboratório, as palhetas foram cuidadosamente examinadas sob um microscópio estereoscópico, para proceder à contagem dos ovos. Após a contagem, as palhetas foram imersas em água desclorada, contidas em bandejas transparentes. Em seguida as palhetas positivas (contendo ovos) foram colocadas em estufa, com termoperíodo e fotoperíodo regulados à temperatura de $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 75 a 90% e fotoperíodo de 10 horas, para eclosão dos ovos e procedimento de criação. Desta forma foram mantidos os espécimes vivos, sob essas condições experimentais, para permitir que atingissem a fase adulta. Todos os espécimes criados foram encaminhados para determinação específica, conforme metodologia descrita por Alencar et al. (2016).

3.5 Identificação dos espécimes

Procedeu-se à identificação específica dos adultos obtidos por observação direta dos seus caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio estereomicroscópio (Zeiss®), utilizando chaves dicotômicas elaboradas por Arnell (1973) e Forattini (2002) e consultando descrições/diagnoses específicas respectivas. Após a determinação específica, todos os espécimes foram incorporados à Coleção Entomológica do Laboratório de Diptera, Fiocruz, sob os títulos de “Coleção Área de Proteção Ambiental do Sana”.

3.6 Análise ecológica

Os dados foram analisados para expressar a relação ecológica entre as populações de Culicidae e a distribuição sazonal. Avaliou-se a abundância relativa de ovos por período chuvoso (novembro, dezembro, janeiro, fevereiro, março, abril) e seco (maio, junho, julho, agosto, setembro, outubro) de acordo com a distribuição média anual das chuvas do Estado do Rio de Janeiro resultante de uma série de dados de 30 anos observados por Marcuzzo e Goularte (2013) e Simon et al. (2013).

Para avaliar se houve ou não diferença estatisticamente significativa entre o número de ovos viáveis coletados no período seco em comparação ao número de

ovos viáveis coletados no período chuvoso utilizou-se o teste de Shapiro-Wilks. Para análises não paramétricas, aplicou-se o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, uma vez que os dados mostraram não seguir a distribuição normal. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises das amostras independentes usando o teste t de Student foram realizadas usando o software BioEstat versão 5.3.

3.7 Dados meteorológicos

Os dados relativos à temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar, foram obtidos através de solicitação ao INMET - Instituto Nacional Meteorologia. Estação Meteorológica Automática de Macaé/RJ

4 RESULTADOS

Durante o período compreendido entre outubro de 2016 a abril de 2018, 13.419 ovos de culicídeos foram coletados na Área de Proteção Ambiental do Sana (APAS). Desse total, 2.290 não eclodiram e dos 11.129 que o fizeram e evoluíram até adulto, correspondiam às seguintes espécies respectivamente: 10.946 de *Haemagogus leucocelaenus*, 172 de *Aedes terrens* e 11 de *Haemagogus janthinomys*.

Comparando a totalidade de ovos eclodidos entre o período mais chuvoso e mais seco foi observado que o período chuvoso representou 87% na abundância de ovos eclodidos, enquanto o menor percentual ocorreu no período seco com 13% (Tabela 2). Entretanto, considerando isoladamente a totalidade dos ovos coletados no período chuvoso 83,5% eclodiram e 16,5% não eclodiram. Cabe ressaltar, quando comparada com o período seco o percentual de ovos eclodidos foi de 78,2% e de ovos não eclodidos foi 21,8%. Assim sendo, a diferença de ovos eclodidos do período chuvoso e relação ao período seco foi de apenas 5,4%. O ponto 3 apresentou a maior abundância de ovos, tanto no período chuvoso, com 59%, quanto no período seco, com 57%.

A segunda maior abundância pode ser observada no ponto 2, com 23% no período chuvoso e 27% no período seco. Por fim, o ponto 1 foi o que apresentou a menor abundância de ovos quando comparado aos demais, com apenas 16% na estação seca e 18% na estação chuvosa.

Tabela 2. Abundância de ovos de Culicidae coletados durante o período seco e chuvoso na Área de Proteção Ambiental de SANA, município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018.

Ovos	Período seco	Período chuvoso	Total
Ovos eclodidos	1.056	10.073	11.129
Ovos não eclodidos	296	1.994	2.290
Total	1.352	12.067	13.419

Inicialmente empregou-se o teste de Shapiro-Wilks para análise do número de ovos eclodidos dos períodos seco e chuvoso. Como os dados não tiveram distribuição normal, em seguida, realizou-se uma análise não paramétrica com o

teste de Mann-Whitney. Este teste apresentou p-valor $< 0,05$ indicando que houve uma diferença muito significativa entre os dados de ovos eclodidos coletados no período seco e no período chuvoso (Figura 19).

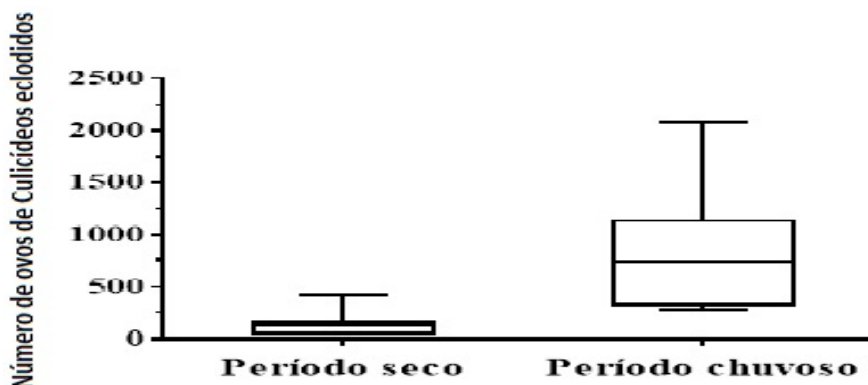


Figura 19. Análise comparativa do número de ovos de Culicídeos eclodidos coletados durante o período seco e período chuvoso coletados na Área de Proteção Ambiental de Sana, município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, de outubro de 2016 a abril de 2018.

Através da análise de amostras independentes, por meio do Teste t, pode ser observada uma diferença significativa do número de ovos eclodidos no período seco quando se compara o ponto de coleta 1 ao ponto de coleta 2 e também ao ponto 3 que houve uma diferença significativa entre esses pontos de coleta, todos com p-valor $< 0,05$ (p-valor 0,0127 e p-valor 0,026 respectivamente) (Figura 20).

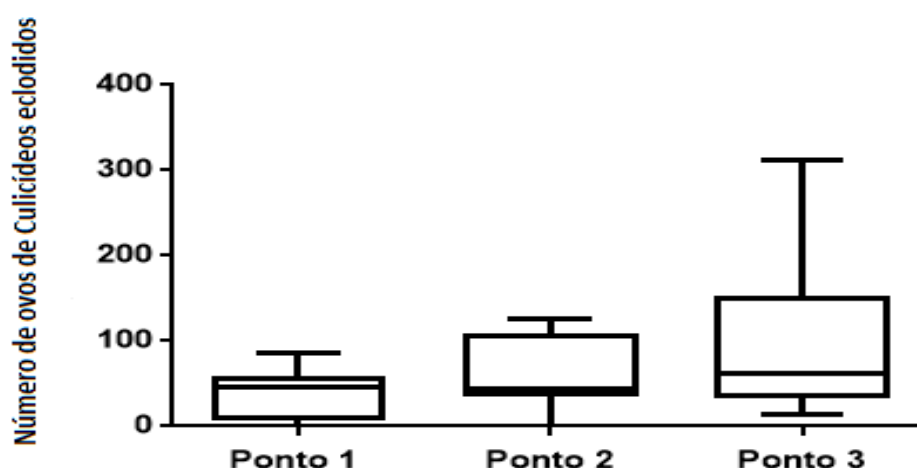


Figura 20. Diferença entre o número de ovos de Culicídeos eclodidos coletados durante o período seco dos locais de coleta 1, 2 e 3, na Área de Proteção Ambiental de Sana, município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Utilizando a análise de Kruskal-Wallis pode-se observar uma diferença significativa no número de ovos coletados no período chuvoso quando comparados os pontos 1, 2 e 3 (p-valor 0,0027) (Figura 21).

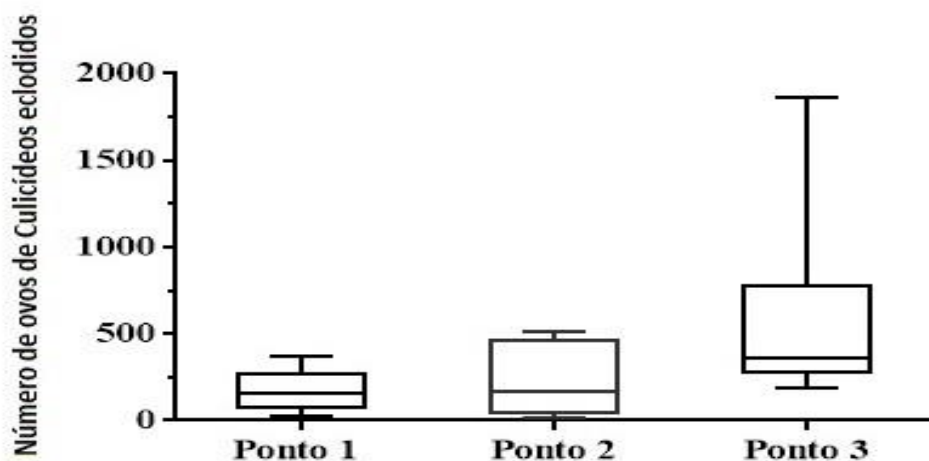


Figura 21. Comparação do número de ovos de Culicídeos eclodidos coletados nos Pontos 1, 2 e 3 durante a estação chuvosa na Área de Proteção Ambiental do Sana, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Para análise específica da eficácia das armadilhas ovitrampas calculou-se o Índice de Positividade de Ovitrapa (IPO) = (Nº armadilhas positivas / Nº ovitrampas inspecionadas x 100). O resultado do IPO foi de 100% (Tabela 3), revelando grande sensibilidade para indicar a presença do vetor. O índice de densidade de ovos permitiu detectar flutuações temporais da população reprodutivamente ativa das populações de *Hg. leucocelaenus*, registrando-se o maior índice no período chuvoso (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de positividade de ovitrapa (IPO), índice de densidade de ovos (IDO), e Taxa de eclosão (TE) dos ovos de Culicidae coletados na Área de Proteção Ambiental do SANA, município de Macaé, estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018.

Estação	IPO (%)	IDO	TE (%)
Seca	100	111,066	63
Chuvosa	100	783,533	86

IPO = (Nº armadilhas positivas / Nº ovitrampas instaladas x 100)

IDO= Número de ovos/Número de armadilhas positivas

TE= Número de ovos coletados x 100/Número de ovos eclodidos

Observou-se que as armadilhas instaladas no ponto de coleta 3, área mais distante de residências da região, apresentaram o maior número de ovos coletados. Por outro lado, o menor índice de positividade foi detectado no ponto amostral 1 que está situado mais afastado do Rio Sana.

Quanto à distribuição de *Hg. leucocelaenus* no decorrer dos meses de coleta, observou-se que o maior número de espécimes encontrados ocorreu entre os meses de novembro a abril, sendo o mês dezembro de 2016 com maior abundância da espécie.

A correlação dos fatores abióticos foi significativa para *Hg. leucocelaenus* em relação à temperatura (Tabela 4) (Figura 22) e em relação à precipitação (Tabela 4) (Figura 23), não apresentando correlação com umidade relativa do ar (Tabela 4).

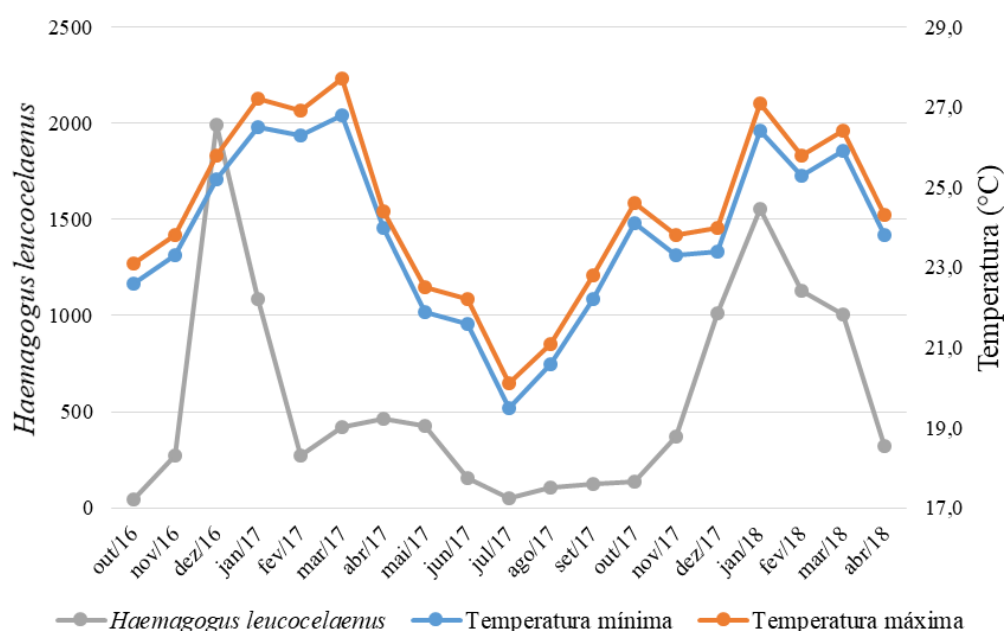


Figura 22. Dados de temperatura (temperatura mínima e temperatura máxima) e valor absoluto de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* coletados na Área de Proteção Ambiental do Sana, município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, de outubro de 2016 a abril de 2018.

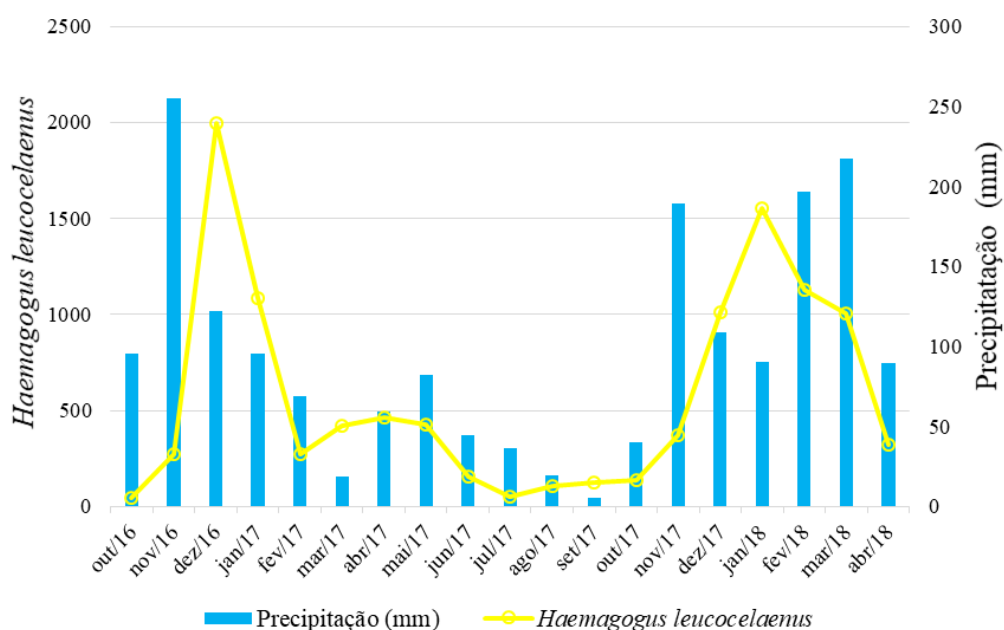


Figura 23. Chuva (mm) e valor absoluto de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* coletados na Área de Proteção Ambiental do Sana, município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018.

Tabela 4. Correlação de Spearman entre a densidade de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* e os fatores abióticos (temperatura, precipitação e umidade relativa ar) coletados na Área de Proteção Ambiental do SANA, município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2016 e abril de 2018.

Variáveis	Coefficiente de correlação (r)	p-valor
Temperatura	0,670**	0,002
Precipitação	0,507*	0,027
Umidade relativa do ar	-0,068 ^{ns}	0,783

* A correlação é significativa no nível 0,05.

** A correlação é significativa no nível 0,01.

^{ns} Não significativo.

Descrever características epidemiológicas dos casos confirmados da FAS que ocorreram na Área de Proteção Ambiental do Sana e na circunvizinhança.

Para descrever a distribuição de casos suspeitos e confirmados de febre amarela em primatas não humanos e humanos, a fonte de dados foi o banco de registro da Secretaria estadual de Saúde do Rio de Janeiro. No período compreendido de março de 2017 a dezembro de 2018 foram confirmados (12 casos) humanos de Febre Amarela Silvestre nos Municípios de Macaé e Casimiro de Abreu. No Município de Casimiro de Abreu ocorreu um óbito local de um cidadão do sexo masculino de 38 anos no mês de março de 2017 (Tabela 5).

O Município de Macaé registrou 12 notificações, onde sete foram descartados e cinco notificações confirmadas pelo exame de RT-PCR, dessas confirmações dois humanos evoluíram para óbito. Do total de pessoas que se infectaram e adoeceram na região a média de idade dos pacientes confirmados para doença, foi de 50,4 anos e 60% da doença acometeram pessoas do sexo masculino e excetuando o paciente morador de Córrego do Ouro, a data das prováveis infecções ocorreram nos meses de abril e maio de 2017 (SES 2018) (Tabela 5)

Tabela 5. Casos notificados para FA no Município de Casimiro de Abreu e Macaé, Estado do Rio de Janeiro.

Município	Notificados	Descartados	Confirmados
Casimiro de Abreu	17	10	7
Macaé	12	7	5

Fonte: SES. RJ. Divisão de Dados Epidemiológicos e Ambientais RJ, consulta feita ao banco de dados do Sinan em julho de 2019.

Tabela 6. Distribuição dos casos confirmados de Febre Amarela Silvestre no município de Macaé, Estado do Rio de Janeiro.

Bairro	Confirmado para FAS	Sexo	Idade	Data de Provável infecção	Óbito
A- Areia Branca	Sim	M	64	30/04/2017	Sim
B- Sana	Sim	F	42	07/04/2017	Não
C-Trapiche	Sim	F	69	29/04/2017	Não
D- Glicério	Sim	M	49	26/04/2017	Sim
E- Córrego do Ouro	Sim	M	28	30/05/2017	Não

Fonte: SES. RJ. Divisão de Dados Epidemiológicos e Ambientais RJ, consulta feita ao banco de dados do Sinan em julho de 2019.

Procedimento Operacional Padrão (POP)

Este Procedimento Operacional Padrão (POP), foi criado com a finalidade de servir de guia para manutenção de manuseio de imaturos em Laboratório, tem como objetivo direcionar as atividades de manuseio de paletas com ovos de culicídeos em laboratório de entomologia, direciona de forma objetiva e prática as atividades da rotina visando atender à demanda utilizados em ensaios biológicos (estocagem de ovos, eclosão larvária, manutenção das larvas e pupas, e criação até o estágio de adulto). Este POP traz detalhes de manuseio voltados não somente para mosquitos do gênero *Haemagogus*, assim como, para espécies do gênero *Aedes*, e tem como público alvo profissionais que atuam em laboratório de entomologia e ensina passo a passo, detalhes atribuídos a rotina da criação de imaturos de Culicídeos até a fase adulta .

5 DISCUSSÃO

O conhecimento da bioecologia de mosquitos é de extrema relevância, especialmente em situações de decomposição por ação biológica ou na conservação de determinada região geográfica, com as específicas consequências no panorama epidemiológico. Considerando que a diversidade de populações pode ter implicações expressivas sobre o risco de transmissão de agentes etiológicos para humanos por vetores biológicos.

No Brasil há uma tendência da reemergência da FAS, resultando em surtos de diferentes extensões e magnitudes, depois do aumento da área de circulação viral ocorrido entre 2016 e 2018, na qual o vírus afetou o sudeste do país (Brasil 2018), conforme o Boletim Epidemiológico de 2017 da SVS, no período de monitoramento de julho de 2014 a junho de 2017. Nesse período, registraram-se alterações no padrão da ocorrência de casos humanos e epizootias em primatas não humanos durante o período sazonal da doença (dezembro a maio), com maior incidência de casos humanos em viajantes que exerciam atividades de turismo e lazer (Brasil 2018). Em geral, a transmissão do vírus de Febre Amarela ocorre dentro de florestas, atingindo principalmente homens em atividades como: corte de madeira, pesca, caça (Hervé, 1986).

Desde 1930 sabe-se que a transmissão de Febre amarela silvestre ocorre entre mosquitos de hábitos acrodendrófilos (Lutz, 1930). Segundo Galindo & Trápido (1955), *Hg. leucocelaenus* parece apresentar hábitos arborícolas, alimentando-se raramente sobre indivíduos que se encontram ao nível do solo. *Hg. leucocelaenus* já foi considerado vetor de pouca importância nas Américas, entretanto seu papel na transmissão da FAS tem sido reconhecido na última década. Um estudo recente sobre a fauna de mosquitos em áreas do sudeste e do estado da Bahia, durante um grande surto silvestre de febre amarela ocorrido entre 2017 e 2018, revelou o *Hg. leucocelaenus* como a espécie mais difundida e abundante nos 28 municípios estudado. Além de, junto com *Hg. janthinomys*, ter sido encontrado infectado em quase todas essas localidades de ocorrência do surto (Abreu et al. 2019).

No presente estudo foram encontradas estas duas importantes espécies do ponto de vista epidemiológico na transmissão de arbovírus: *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*. Observamos que houve uma predominância de *Hg. leucocelaenus*. Segundo Chadee et al. (1995) essa espécie é essencialmente silvestre, e desenvolvem suas atividades durante o período diurno. Esse culicídeo é comumente

encontrado no Brasil e sua importância epidemiológica relaciona-se à atuação na transmissão de arboviroses, dentre elas a febre amarela (Kumm & Cerqueira 1951).

O monitoramento de mosquitos vetores de agentes etiológicos com auxílio de armadilhas de ovitrampas traz resultados de forma rápida e de custos extremamente acessíveis na área da pesquisa básica. Dessa forma, esse método é uma ferramenta de relevância na vigilância entomológica, especialmente em áreas que tenham indicativo de ocorrência de arbovírus transmitidos por Culicidae.

Observamos que a maioria das posturas dos ovos nas palhetas foi sempre de uma mesma espécie, com exceção dos meses de março, maio e dezembro, fato que corrobora os resultados obtidos por Chadee et al. (1992), os quais demonstraram uma tendência por parte dessas fêmeas em evitar os locais onde já se encontram outras posturas.

Segundo Alencar et al. (2013), *Hg. leucocelaenus* foi encontrado com as maiores densidades ao longo das estações climáticas e colonizando todas as armadilhas de ovitrampas instaladas em várias alturas, sugerindo que a espécie apresenta um comportamento de distribuição vertical generalista. Este resultado se apresenta de acordo com o encontrado no presente estudo, assinalando uma forte presença nos dois períodos climáticos analisados.

Alencar et al. (2015) realizaram um estudo na Reserva Ecológica de Guapiaçu, estado do Rio de Janeiro, constatando que o maior número de espécimes de *Hg. leucocelaenus* ocorreu em abril e dezembro. Da mesma forma, no presente estudo, foi observado um pico no número de *Hg. leucocelaenus* em abril e dezembro. O maior número absoluto de indivíduos de *Hg. leucocelaenus* foi observado em dezembro de 2016.

Galindo et al. (1950) e Trapido & Galindo (1957) ressaltaram que a captura das espécies de *Haemagogus* ocorrem principalmente durante os meses mais chuvosos. *Haemagogus leucocelaenus* mostrou uma correlação positiva com a precipitação e temperatura média, indicando influência desses dois fatores abióticos em seu comportamento e no aumento de sua densidade populacional nas estações chuvosas. Esses resultados apresentam-se de acordo com as observações realizadas por Resende et al. (2013) que relataram um resultado positivo e correlação positiva entre precipitação pluviométrica e frequência mensal para *Hg. leucocelaenus*.

Segundo Alencar et al. (2008) a distribuição sazonal das umidades relativas nas duas localidades (município de Uruaçu, Estado de Goiás e Reserva Biológica do

Tinguá, Estado do Rio de Janeiro) onde a espécie foi coletada, explica a oposição dos seus ciclos sazonais de atividade. Igualmente, a umidade relativa explica claramente as diferenças no ciclo diurno do *Hg. leucocelaenus*. No Município de Niquelândia, estado de Goiás, *Hg. leucocelaenus* apresentou o pico de atividade no meio do dia e desapareceu devido a umidade relativa bem inferior nesse período (~75%). *Haemagogus capricornii* parece necessitar apenas de temperaturas elevadas (~28°), suportando higrometrias mais baixas e variadas (60%-85%). Silva et al. (2018) observaram que *Hg. leucocelaenus* apresentou correlação positiva com precipitação pluviométrica e ponto de orvalho máximo e correlação negativa com a direção do vento.

Nimer (1979) ressalta que em algumas regiões do Brasil ocorrem alternâncias entre as características de clima tropical e temperado, assim podemos considerar que nas regiões geográficas estudadas o caráter de clima tropical é mais marcante do que o temperado.

Tátilla-Ferreira et al. (2017) observaram que em relação a armadilhas de ovitrampas instaladas em diferentes alturas, desde o nível do solo até 8 metros de altura, não houve diferença significativa, tendo as mesmas recebido quantidades similares de ovos. Tal fato mostra que *Hg. leucocelaenus* explora os diferentes níveis do estrato arbóreo, o que pode favorecer a transmissão de patógenos entre animais arborícolas (i.e. primatas) e o homem.

Haemagogus leucocelaenus é uma espécie oportunista e eclética quanto ao hábito alimentar, fatores importantes a serem considerados na mobilidade entre copa e solo na procura de hospedeiro (Alencar et al., 2008).

Segundo Forattini (1978), *Hg. janthinomys*, *Haemagogus albomaculatus*, *Hg. leucocelaenus* e *Sabethes chloropterus* permanecem em contato estreito com macacos, sendo abundantes na copa das árvores, onde demonstram uma primatofilia elevada (Davis, 1945).

Galindo et al. (1955) e Alencar et al. (2008) relataram que *Hg. leucocelaenus* foram encontrados em uma maior quantidade próximo da copa das árvores, apresentando uma tendência à acrodendrofilia.

Gomes et al. (2008) relatam que a maior abundância dessas espécies ocorre próximo à copa das árvores, o que aparenta ser devido a uma forte associação da espécie com primatas não humanos, fato que justifica a existência de um elo entre o foco natural de arbovírus e habitações humanas localizadas nos limites de dispersão da espécie.

No presente estudo a maior abundância de ovos eclodidos de *Hg. leucocelaenus* e sua distribuição espacial na APAS foi expressiva para um período considerado seco e não adequado ao seu desenvolvimento. A clara predominância de *Hg. leucocelaenus*, espécie essencialmente silvestre (Chadee et al. 1995) e que desenvolve suas atividades durante o período diurno, com importância epidemiológica relacionada à atuação na transmissão de arboviroses, dentre elas a febre amarela (Kumm & Cerqueira, 1951), sobrealça a importância dos resultados obtidos. Assim sendo, a área experimental tem evidências ativas para a transmissão do vírus causador da FAS.

Dentre as espécies de mosquitos que apresentam comportamento de atividade na copa arbórea e que depositam os ovos em buracos em árvore situados em locais muito altos encontramos no presente estudo *Aedes terreus*. Lourenço-de-Oliveira & Anna-Bella Failloux (2017) constataram em ensaio experimental, que população de *Aedes terreus* se mostraram competente para transmitir o vírus Chikungunya.

Conforme foi observado por Couto-Lima e colaboradores 2020, fatores climáticos como : temperatura e pluviosidade exerceram expressiva influência no resultado da ovoposição de fêmeas de *Haemagogus leucocelaenus* em estudo de longa duração realizado em área de Mata Atlântica em um município do sudeste do Brasil

Tendo em vista o recente surto de Febre Amarela Silvestre (FAS) no estado Rio do Janeiro, mapear a diversidade e conhecer a bionomia de forma mais abrangente dos principais vetores biológicos responsáveis pela manutenção do ciclo natural da FAS nas áreas suscetíveis é de elevada importância epidemiológica, pois ainda não se tem o conhecimento suficiente sobre as interações ecológicas dessas populações.

Consideramos que a forte presença de espécimes dos principais vetores do vírus no Brasil torna premente que seja dedicada especial atenção à vigilância para o surgimento de doenças febris entre pessoas visitantes da área de proteção ambiental, nas comunidades presentes nas áreas do entorno ou ainda na população local.

6 PERSPECTIVAS

No Brasil há uma tendência da re-emergência da FAS, resultando em surtos de diferentes extensões e magnitudes, depois do aumento da área de circulação viral ocorrido entre 2016 e 2017, na qual o vírus afetou o Sudeste do país. Durante o período de julho de 2014 a junho de 2017, registraram alterações no padrão da ocorrência de casos humanos e epizootias em primatas não humanos durante o período sazonal da doença, com maior incidência de casos humanos em viajantes que exerciam atividades de turismo e lazer (Brasil, 2018)

Este estudo permitiu compreender diferentes aspectos e dimensões do comportamento da febre amarela em nosso país. O conhecimento das populações de mosquitos é de fundamental relevância, particularmente em situações de decomposição por ação biológica ou na conservação de determinada região, com as respectivas implicações no panorama epidemiológico, uma vez que a diversidade ecossistêmica pode ter implicações significativas sobre o risco de transmissão de agentes etiológicos para humanos por vetores biológicos.

A partir desse paradigma de incertezas em relação às doenças veiculadas por vetores surge um novo desafio para comunidade científica avançar em novas tecnologias e conhecimentos. Desta forma, diante dessa nova realidade, acredito que a partir dos resultados apresentados e da confecção do Procedimento Operacional Padrão (POP) e a sua aplicação de forma prática em laboratórios de entomologia, venha contribuir para facilitar o cotidiano dessas atividades alinhado com a vigilância entomológica de caráter permanente podem contribuir para a condução mais efetiva e eficaz do estabelecimento de uma vigilância de epizootias e entomológica no Sistema Único de Saúde, com a colaboração de diferentes esferas governamentais (Secretaria de Saúde, ICMbio, FIOCRUZ) para a prevenção da Febre Amarela Silvestre na região.

7 CONCLUSÕES

As espécies mais abundantes foram: *Haemagogus leucocelaenus*, *Aedes terreus* e *Haemagogus janthinomys*.

Haemagogus leucocelaenus, a espécie mais numerosa, se destaca pelas altas incidências registradas na área de estudo, principalmente nos períodos de chuvas, a segunda espécie mais abundante foi *Aedes terreus* potencial vetor do vírus Chikungunya em ensaio experimental.

A frequência sazonal de *Hg. leucocelaenus* mostrou mais favorável entre os meses de novembro a abril, e maior abundância no mês de dezembro de 2016.

Foi constatado que 83% dos ovos coletados nesse estudo evoluíram até a fase adulta e os ovos não eclodidos apresentaram menor número no período seco quando comparado ao período chuvoso.

O ponto de coleta 3 apresentou a maior abundância de ovos, tanto no período chuvoso, com 59%, quanto no período seco, com 57%.

Analisando a ocorrência da febre amarela no Brasil, na região sudeste foi possível observar que casos positivos no Município de Macaé no ano de 2017 apresentaram uma prevalência de 60% em cidadãos do sexo masculino.

Em conclusão a incidência de espécies normalmente incriminadas na transmissão de patógenos, a área de estudo e o seu entorno encontra-se vulnerável a ocorrência de casos de Febre Amarela Silvestre.

O uso da armadilha de ovoposição instaladas em áreas silvestre se constitui uma importante ferramenta para monitorar a presença de mosquitos do gênero *Haemagogus*. O que torna uma salutar alternativa para uma vigilância entomológica constante e eficaz.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu FVS, De Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, Santos AAC, Miranda RM, Souza IB, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016-2018. *Emerg Microbes Infect.* 2019; 8: 218-231.
- Albuquerque BC. Febre Amarela. In: Tavares W, Marinho LAC. Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 403-08.
- Alencar J, Dégallier N, Hannart A, Silva JS, Pacheco JB, Guimarães AE. Circadian and seasonal preferences for hematophagy among *Haemagogus capricornii*, *Hg. janthinomys* and *Hg. leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *J Vector Ecol* 2008; 33 (2): 389-92.
- Alencar J, Morone F, de Mello, CF, Dégallier N, Lucio PS, Serra-Freire NM, Guimarães AE. Flight height preference for oviposition of mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of sylvatic yellow fever virus near the hydroelectric reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. *J Med Entomol* 2013; 50 (4): 791-5.
- Alencar J, de Mello CF, Guimarães AÉ, Gil-Santana HR, Silva JS, Santos-Mallet JR, Gleiser RM. Temporal dynamics in Guapiaçu Ecological Reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. *Plos One* 2015; 10: 1-16.
- Alencar J, de Mello CF, Gil-Santana HR, Guimarães AÉ, de Almeida SAS, Gleiser RM. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol* 2016; 41: 18-26.
- Andreadis, T. G. 1990. Observations on the installment egg hatching in the Brown Salt Marsh mosquito, *Aedes cantator*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6:727-729.
- Anyamba A, Small JL, Britch SC, Tucker CJ, Pak EW, Reynolds CA, Crutchfield J, Linthicum KJ. Recent weather extremes and impacts on agricultural production and vector-borne disease outbreak patterns. *PloS One* 2014; 9 (3): 1-9.
- Araújo FAA, Ramos DG, Santos AL, Passos PHO, Elkhoury ANSM, Costa ZGA, Leal SG, Romano APM. Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009. *Epidemiol Serv Saúde* 2011; 20 (4): 527–536.
- Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib Am Entomol Inst* 1973; 10(2): 1-174.

- Béranger-Féraud, – Traité théorique et clinique de la fièvre jaune. Octave Doin Edit. Paris; 1890.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS). Fundação Nacional de Saúde. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor manual de normas técnicas, 3 ed. Rev Brasília; 2001.84 p.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica, 7. ed. Série A. Brasília: Ministério da Saúde. Normas e Manuais Técnicos; 2009. 819 p.
- Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Epidemiologia e Serviços de Saúde- [Internet]. 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/revista_epi_vol19_n2.pdf acesso em 08 de setembro de 2020.
- Brasil. Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento de casos e óbitos de Febre Amarela no Brasil/ Relatório 43/2017. [Internet. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza---o-em-31maio2017.pdf> acesso em 12 fevereiro de 2020.
- Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela- informe 26 [Internet]. 2018. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/imagens/pdf/2018/maio/18/Informe-FA-26.pdf> acesso em 14 de fevereiro de 2020.
- Brés PLJ. A century of progress in combating yellow fever. Bull. Wld Hlth Org 1986; 64: 775-86.
- Camargo-Neves VLF, Poletto DW, Rodas LAC, Pachioli ML, Cardoso RP, Scandar SAS, Sampaio SMP, Koyanagui PH, Botti MV, Mucci LF, Gomes AC. Investigação entomológica em área de ocorrência de febre amarela silvestre no Estado de São Paulo, Brasil. Cad Saúde Pública. 2005; 21 (4): 1278–86.
- Cardoso JC, Almeida MAB, Santos E, Fonseca DF, Sallum MAM, Noll CA, et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, Southern Brazil, 2008. Emerg Infect. Dis. 2010; 16: 1918-24.
- Chadee DD, Tikasingh ES, Ganesh R. Seasonality, biting cycle and parity of the yellow fever vector mosquito *Haemagogus janthinomys* in Trinidad. Med Vet Entomol 1992; 6: 143-8.

- Chadee DD, Ganesh R, Hingwan JO, Tikasingh ES. Seasonal abundance, biting cycle and parity of the mosquito *Haemagogus leucocelaenus* in Trinidad, west Indies. *Med Vet Entomol* 1995; 9 (4): 372-6.
- Clements, A. N. 1963. *The physiology of mosquitoes*. Oxford: Pergamon Press.
- Clements AN, Harbach RE. History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *J Vector Ecol* 2017; 42: 208-222.
- Costa ZGA. Estudo das características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, nas áreas fora da Amazônia Legal, no período de 1999 a 2003. Study of the epidemiologic characteristic of the yellow fever in Brazil [periódicos na Internet]. 2005 [acesso em 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13327>.
- Couto-Lima D, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MA, Santos FA, Vazeille M, Vaconcelos PFC, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil by competent *Aedes* populations. *Scientific Reports* 2017; 7:1-12.
- Couto-Lima D, Andreazzi C S, Leite P J, Bersot M I L, Alencar J, Lourenço-de-Oliveira R. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the Atlantic Forest, southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. Vol 115: e 200218, 2020
- Consoli RAGB, Lourenço -de- Oliveira R. *Principais Mosquitos de importância Sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz, 1994.
- Davis DD. A comparison of mosquitos captured with avian bait and human bait. *Proc Ent Soc Wash* 1945; 47 (8): 252-6.
- Dégallier N, Hervé JP, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos, PFDC, Rosa, JFSTD; Sá Filho GC. A ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisas atuais e perspectivas. *Revista da Sesp*. 1986; 31 (2): 127-129.
- Dégallier N, Monteiro HADO, Castro FC, Silva OVD, Filho GCS, Elguero E. Na indirect estimation of the developmental time of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), the main vector of yellow fever in South America. *Studies Neotropical Fauna Environment* 2006; 41 (2): 117-22.
- FIOCRUZ/ INVIVO. Fundação Oswaldo Cruz.
<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=1386&sid=7> Acesso em 10 de maio de 2020

- Forattini OP, Gomes AC, Galati, EAB, Rabelo EX, Iversson, LB. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no sistema da serra do mar, Brasil. 1- Observações no ambiente extradomiciliar. Rev Saúde Pública 1978; 12 (3): 279-325.
- Forattini OP. Culicidologia Médica. Princípios Gerais, Morfologia, Glossário Taxonômico. vol. 1. São Paulo: EdUsp; 1996.
- Forattini OP. Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia. vol. 2. São Paulo: EdUsp; 2002.
- Franco O. History of the Yellow fever in Brazil. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1969; 2: 315-512.
- Galindo P, Trapido H, Carpenter SJ. Observations on diurnal forest mosquitoes in relation to sylvan yellow fever in Panama. Am J Trop Med Hyg 1950; 30 (4): 533-74.
- Galindo P, Carpenter SJ, Trapido H. A contribution to the ecology and biology of tree hole breeding mosquitoes of Panama. Annals of the Entomological Society of America 1955; 48 (3): 158-164.
- Gillett, J. D. 1955a. Variation in the hatching response of *Aedes* eggs (Diptera: Culicidae). Bulletin of Entomological Research 46:241-254.
- Gomes AC, Torres MAN, Gutierrez MFC, Lemos FL, Lima MLN, Martins JF, Costa ZGA. Registro de *Aedes albopictus* em áreas epizoóticas de febre amarela das Regiões Sudeste e Sul do Brasil (Diptera: Culicidae). Epidemiologia e Serviços de Saúde 2008; 17(1): 71-76.
- Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa 2007; 1668: 591–638.
- Harbach, R. Family Culicidae Meigen, 1818. Mosquito Taxonomic Inventory. 2008. Available: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/family-culicidae-meigen-1818#>.
- Hervé JP, Dégallier N, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Sá Filho GC. Arboviroses. Aspectos ecológicos. In: Instituto Evandro Chagas. Evandro Chagas 1936-1986, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém, Brasil: Fundação Serviço Especial de Saúde Pública 1986; 1: 409-37.
- Kumm HW, Cerqueira NL. The *Haemagogus* mosquitoes of Brazil. Bull Entomol Res 1951.
- Lamarre GPA, Molto Q, Fine PVA, Baraloto C. A comparison of two common flight interception traps to survey tropical arthropods. Zookeys 2012 ; 216: 43-55.

- Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. High risk for chikungunya vírus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PloS Negl Trop Dis* 2017 ; 11 (6) : e0005698.
- Lutz, Adolfo – Reminiscências da febre-amarela no Estado de São Paulo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1930; 24 (3): 127–42.
- Marcondes CB, Alencar J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Revista Biomed* 2010; 21: 221-238.
- Marcuzzo FF, Goularte ER. Caracterização do ano hidrológico e mapeamento espacial das chuvas nos períodos úmido e seco do estado do Tocantins. *Rev Bra Geogr Fís* 2013; 6: 91-9.
- Méndez MR, Calisher CH, Kruger H, Sipan F, Sánchez S, Lazuick JS. Foco permanente de fiebre amarilla en el valle del río Apurimac, Ayacucho, Perú, y primer aislamiento Del vírus de La fiebre amarilla en ese país. *Bol. Oficina Sanit Panam* 97 (3): 215-24, 1984.
- Mondet B, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa ES, Rodrigues SG, Travassos da Rosa JFS, Bicout. DJ. Isolation of Yellow Fever Virus from Nulliparous *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* in Eastern Amazonia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002; 2 (1): 47-50.
- Moreno ES, Rocco IM, Bergo ES, Brasil RA, Siciliano MM, Suzuki A, et al. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; 44(3):290-296.
- Neves DP, Melo AL, Genaro O. *Parasitologia humana*. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2011.
- Nimer E. *Climatologia do Brasil- 4º Volume*. Rio de Janeiro: Fundação Brasileira de Geografia e Estatística; 1979.
- Prefeitura Municipal de Macaé. Secretaria de Ambiente e Sustentabilidade. SANA. Disponível em: <https://www.macaee.rj.gov.br/sema/conteudo/titulo/sana>>. Acesso em janeiro 2020
- Resende MC, Silva IM, Ellis BR, Eiras AE. A comparison of larval, ovitrap and MosquiTRAP surveillance for *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz Academic Press* 2013; 108: 1024-30.
- SES RJ - Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Informe epidemiológico 001/2017. Monitoramento das emergências em saúde pública - Febre Amarela. <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=xjekgJZZmu4%3d>. Acesso em 11 de março 2020.

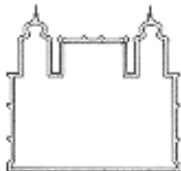
- SES RJ - Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Informe epidemiológico 082/2017. Monitoramento das emergências em saúde pública - Febre Amarela. <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=OccHA6ZeaHE%3d> Acesso em 11 de março 2020.
- SES RJ - Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Informe epidemiológico 016/2018. Monitoramento das emergências em saúde pública - Febre Amarela. <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=ZgyFw%2fojg2E%3d> Acesso em 11 de março 2020.
- Silva LJ. O Controle das endemias no Brasil e sua história, Ciência e Cultural, volume 55 (1). São Paulo; 2003.
- Silva SO, Mello CF, Figueiró R, Maia DA, Alencar J. Distribution of the mosquito communities (Diptera: Culicidae) in oviposition traps introduced into the Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2018; 18: 214-221.
- Silver JB. Mosquito ecology: field sampling methods. 3rd ed. New York: Springer. 2008.
- Simon FW, Pickbrenner K, Marcuzzo FFN. Estudo do regime hídrico pluvial e fluvial em bacia Hidrográfica com precipitação homogênea. [Apresentação no XX Simpósio Brasileiro de recursos Hídricos. Bento Gonçalves 2013; 1: 1-8; Rio Grande do Sul, Brasil].
- Spielman D'Antônio. Mosquito. New York: Hyperion; 2001.
- Tátilla-Ferreira AT, Maia DA, Abreu FVS, Rodrigues WC, Alencar J. Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera:Culicidae), a vector of wild yellow fever in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2017; 59: 1-6.
- Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 1999. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue *Epidemiology and Preventive Measures of Dengue*. IESUS 8: 5–33.
- Trapido H, Galindo P. Mosquitoes associated with sylvan yellow fever near Almirante Panama. *Amer J Trop Med Hyg* 1957; 6: 114-4.
- Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, Dias JP, Monteiro HA, Oliva OF, Vasconcelos HB, Oliveira RC, Sousa MR, Barbosa Da Silva J, Cruz AC, Martins EC, Travassos Da Rosa JF. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol*. 2001 Nov; 65(3):598-604.
- Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36 (2): 275–293.

Vasconcelos PF, Monath TP. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2016.16 (8) 566-7.

Wilkerson RC, Linton YM, Fonseca DM, Schultz TR, Price DC, Strickman DA. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0133602. doi: 10.1371/journal.pone.0133602 PMID:26226613.

9 APÊNDICE

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA O MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC, ASSIM COMO, PARA USO EM LABORATÓRIOS DE ENTOMOLOGIA QUE FAZEM USO DA MODALIDADE DE CAPTAÇÃO DE OVOS DE CULICIDEOS ATRAVÉS DO EMPREGO DE OVITAMPAS.



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

64/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de Aplicação
3. Definições
4. Siglas
5. Responsabilidades
6. Procedimentos
7. Referências Bibliográficas

1 OBJETIVO

Este POP tem como objetivo estabelecer uniformidade na recepção e manuseio de palhetas de armadilhas ovitrampas oriundas das atividades de campo realizadas pelo Laboratório de Diptera/IOC.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

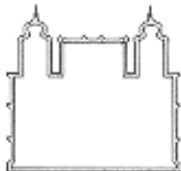
Este POP aplica-se ao Laboratório de Diptera / seção criação de culicídeos e a Laboratórios de Entomologia em geral.

3 DEFINIÇÕES

As seguintes definições são elaboradas para o uso deste POP.

Palheta: placa de madeira compensada (Eucatex) de 4 cm x 14 cm.

Armadilha para coleta de ovos de mosquitos.(ovitrampa)



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

65/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

Água desclorada: consiste na água do sistema de abastecimento de água pública local, armazenada em galões, pelo período mínimo de 24 horas antes do uso

4 SIGLAS

FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão
LABDIP	Laboratório de Diptera
mL	Mililitro
L	Litro
cm	Centímetro
B.O.D	Câmara de incubação

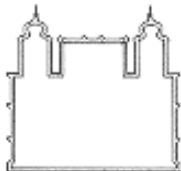
5 RESPONSABILIDADES

5.1 Chefia do laboratório:

a) Autorizar a atualização do POP conforme as necessidades surgidas no desenvolvimento das atividades do laboratório e fornecer os insumos e os materiais necessários para manter a estrutura física do laboratório e manutenção de bens de consumo e duráveis.

5.2 Profissionais do LABDIP:

- a) Utilizar os equipamentos e todo material de proteção individual corretamente.
- b) Utilizar os equipamentos de proteção coletiva visando o bem-estar de todos.
- c) Descartar de forma correta as palhetas usadas.
- d) Limpar e guardar todo material após a realização das atividades.



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

66/76

CÓDIGO

POP-LD-002

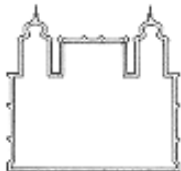
TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

6 PROCEDIMENTO

6.1 Material necessário:

- a) Luvas de procedimento
- b) Jaleco descartável
- c) Bandeja de polietileno (30 cm de comprimento X 22 cm de largura X 6 cm de altura)
- d) Toalha de papel
- e) Água desclorada
- f) Microscópio estereoscópio
- g) Câmaras climatizadas B.O.D com termoperíodo e fotoperíodo 12:12 horas e umidade relativa do ar entre 70-85%.
- h) Pote de acrílico transparente padronizado apresentando a seguinte dimensão (20 cm de comprimento x 9 cm largura x 3 cm de altura)
- i) Pote de plástico com a capacidade 800 ml, com tampa telada e lateral com passagem para capturador manual (de Castro)
- j) Copo plástico de 100 mL
- k) Copo plástico de 500 mL
- l) Ração para peixe básica
- m) Pipeta Pasteur descartável (3mL)
- n) Clorofórmio
- o) Acetato de Etila
- p) Álcool (P.A.)
- q) Capturador manual (De Castro)



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

67/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

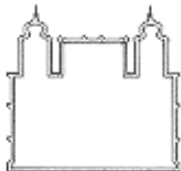
MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

6. 2 Manuseio das palhetas de Eucatex:

As armadilhas para oviposição das fêmeas de mosquitos vetores é uma ferramenta valiosa nos estudos taxonômicos direcionados à vigilância epidemiológica em regiões de ocorrência das arboviroses, pela praticidade e viabilidade de uso por longos períodos (Alencar *et al.* 2004). A armadilha é constituída por pote preto fosco, com capacidade para o volume de 500 ml, sem tampa com três palhetas de madeira compensada (placas de Eucatex), de 4 cm X 14 cm, presas verticalmente no interior da armadilha por clips, peça feita de metal. No pote adiciona-se água natural e serrapilheira, visando reproduzir um ecossistema mais próximo do natural. Após a chegada das palhetas ao laboratório é necessário preparar uma câmara úmida. A câmara úmida consiste em uma bandeja plástica revestida com papel toalha, onde as palhetas são postas horizontalmente sobre a bandeja por um período de dois dias para completar secagem das palhetas (Alencar *et al.* 2014) (Figura 1).



Figura 1. Câmara úmida das palhetas recém-chegadas do campo.



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

68/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

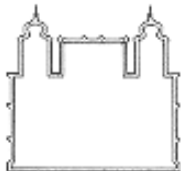
MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

6.3 Contagem dos ovos

Após o período de secagem, deverá ser realizada a observação das palhetas no microscópio estereoscópico com o objetivo de verificar a presença e computar o número de ovos (Marques *et al.* 1993; Anjolette & Macoris 2016; Alencar *et al.* 2016) (Figura 2). Assim sendo, o número de ovos encontrados deve ser registrado no livro de protocolo referente ao projeto de pesquisa que está sendo realizado. Finalizado essa etapa as informações ficarão disponíveis para a consulta no laboratório.



Figura 2. Observação das palhetas em microscópio estereoscópico e em evidência os ovos na palheta (Fonte: Serdeiro, 2019).



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

69/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

6.4 Processo de eclosão

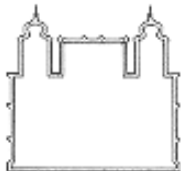
Em seguida as palhetas contendo ovos serão imersas em potes de acrílico transparente ou copo plástico de 500mL contendo água de torneira submetida à aeração por período mínimo de 15 dias (Figura 3). O tempo de permanência dos ovos na câmara climatizada B.O.D será de três dias, sendo realizadas observações diárias. Após esse período, as palhetas devem ser retiradas e as larvas eclodidas contadas. Posteriormente, as palhetas deveram ser expostas à secagem nos próprios potes e acondicionadas por um período de três dias fora da estufa para reimersão, visando o término do desenvolvimento embrionário. Esse processo deve repetido por várias vezes com finalidade de observar a taxa de eclosão (Figura 3).

Nas palhetas imersas, diariamente, deve ser acrescentada água para evitar a adesão dos ovos às paredes dos recipientes e troca do meio líquido deve ser realizada a cada três dias. O termostato e o higrômetro devem ser aferidos com controles de temperatura e umidade anotados três vezes ao dia, utilizando-se de um termômetro de máxima e mínima (mercúrio) e de um termômetro úmido.



Figura 3. Ovos imersos em pote de acrílico contendo água desclorada.

Após o tempo de imersão, retira-se as palhetas da câmara climatizada B.O.D, e transfere a água do pote para a bandeja plástica com a finalidade de observar a presença de larvas (Figura 4).



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

70/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.



Figura 4. Câmara climatizada B.O.D, ovos imersos em bandejas transparentes ou copo plástico de 500mL contendo água.

As larvas eclodidas deverão ser recolhidas cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável e com a utilização de um foco luminoso de uma lanterna incidindo sobre a bandeja para facilitar a visualização das larvas. Seguidamente as larvas serão contadas, transferidas para copo plástico de 100 mL que será inserido no interior de um pote de plástico com a capacidade 800 mL, com tampa telada e lateral com passagem para capturador manual, onde serão criadas até a emergência dos adultos. A água das bandejas de polietileno será substituída semanalmente e a quantidade de larvas encontradas será registrada no livro de protocolo (Figura 5).



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

71/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

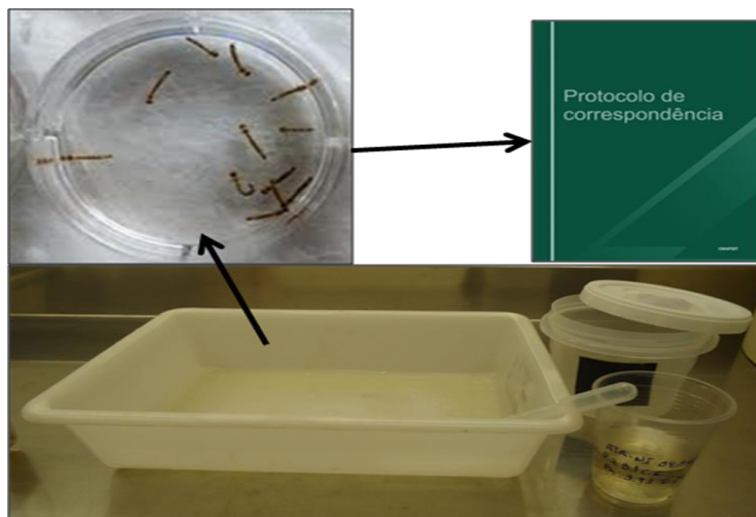


Figura 5. Bandeja onde as larvas são contadas evidenciando as larvas observadas que serão armazenadas em pote plástico e o protocolo onde são feitas as anotações (Fonte: Jules, 2015).

6.5 Criação das larvas

Para a alimentação das larvas será utilizada ração de peixe triturada com o uso de um pistilo e, depois peneirada, até obter pequenas partículas e aplicada diretamente na água, sendo o excesso de alimento e sedimento limpo diariamente (Figura 6). A reposição será realizada quando se observar redução ou evasão da ração. A água das bandejas de polietileno será substituída semanalmente. Nas inspeções diárias, as exúvias retiradas e as ecdises anotadas no livro de protocolo, as pupas serão removidas diariamente e colocadas dentro de gaiolas para a emergência. Paralelamente serão separadas as larvas quando atingirem o quarto estágio, e as exúvias pupais serão contadas e preservadas em álcool 80% e desidratadas em série alcoólica cujas concentrações: desidratação - álcool 70% —15 minutos; álcool 80% — 15 minutos; álcool 90% —15 minutos; álcool 95% —10 minutos; álcool absoluto —10 minutos; clarificação B - creosoto de faia— 24 horas; montagem - com bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula; secagem - preferencialmente em estufa, a 40 - 45°C, o que favorece a eliminação de eventuais pequenas bolhas de ar (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994) (Figura 7).



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

72/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.



Figura 6. Ração para peixe triturada no gral com auxílio do pistilo e colocada para alimentação das larvas na gaiola.



Figura 7. Ependorfs com exúvias pupais preservadas em série alcoólica e montadas entre lâmina e lamínula (Fonte: Alencar, 2018).



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

73/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

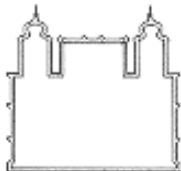
MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

6. 6 Manuseio e identificação dos adultos

Os imaturos que evoluírem até o estágio adulto serão sacrificados com uma solução de éter etílico ou clorofórmio (Figura 8). Em seguida, os adultos serão acondicionados em tubos cônicos fabricados em polipropileno, contendo no fundo uma camada de naftalina (visando à proteção contra pragas), uma camada de algodão e uma membrana circular de papel filtro (visando proteger os espécimes de eventuais quebras de estruturas), permanecendo preservados dessa forma até o momento da identificação (Figura 8). Os espécimes adultos devem ser montados alfinetes entomológicos com auxílio de um suporte de madeira, colocando-se uma pequena gota de esmalte incolor sobre a superfície clara, na ponta livre do triangulo de cartolina (dupla montagem). A seguir encosta-se com cuidado essa ponta na pleura torácica do mosquito que vai ser montado, de maneira que maior parte das pernas fique posicionada na direção do alfinete. Levanta-se o triângulo no alfinete já com mosquito aderido, e com um estilete fino faz-se as correções na sua posição antes que a cola seque. Identificações corretas só poderão ser realizadas com espécimes completos e não danificados (Figura 9).



Figura 8. Mosquitos recém emergidos são capturados (capturador de castro), sacrificados em clorofórmio e acondicionados em tubo falcon com naftalina, algodão e papel filtro.



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

74/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

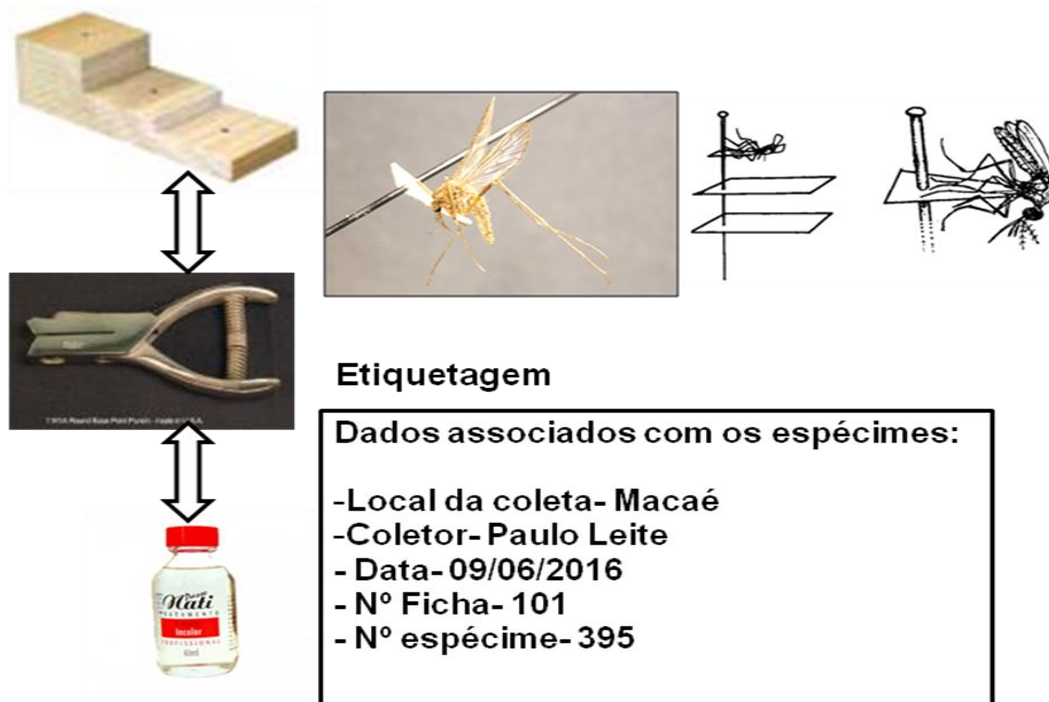
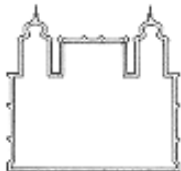


Figura 9. Montagem dos mosquitos adultos com alfinete entomológico e posterior etiqueta confecção da etiqueta de identificação dos espécimes que serão armazenados em gavetas entomológicas (Alencar, 2016).

Procede à identificação específica dos adultos obtidos por observação direta dos seus caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio estereomicroscópio (Zeiss®), utilizando chaves dicotômicas elaboradas por Arnell (1973), Forattini (2002), Marcondes & Alencar (2010) e consultando descrições/diagnoses específicas respectivas (Figura 10A e B). Após a determinação específica, todos os espécimes serão incorporados à Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz (Figura 10C).



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

75/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

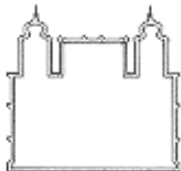


Figura 10: A- Armazenamentos dos mosquitos em gavetas entomológicas B- Sílica para conservação dos espécimes C- Incorporação dos mosquitos na coleção entomológica (Fonte: Aguiar, 2019).

7- Referências Bibliográficas

Alencar J, Gil-Santana HR, Lopes CM, Santos JS, Guimarães AÉ. Utilização de armadilha “ovitrampa” para monitoramento de *Haemagogus janthynomys* (Diptera:Culicidae) em área de Mata Atlântica. Entomol Vect 2004; 11: 369-74.

Alencar J, Gleiser RM, Morone F, Mello, CFD, Silva JDS, Serra-Freire NM, Guimarães AE. A comparative study of the effect of multiple immersions on Aedini (Diptera: Culicidae) mosquito eggs with emphasis on sylvan vectors of yellow fever virus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2014; 109 (1): 114-17.



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

76/76

CÓDIGO

POP-LD-002

TÍTULO

MANUSEIO EM LABORATÓRIO DE PALHETAS ORIUNDAS DAS ATIVIDADES DE CAMPO DO LABDIP/IOC.

Anjolette AFF, Macoris MLG. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. BEPA 2016; 13 (156): 19-29.

Consoli RAGB, Lourenço -de- Oliveira R. Principais Mosquitos de importância Sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, 1994.

Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera, Culicidae). Mosq Syst 1981; 13 (1): 1-81.

Forattini OP. 2002. Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia. vol. 2. São Paulo: Ed Usp; 2002.

Lane J. Neotropical Culicidae.vol. 1. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo; 1953a.

Lane J. Neotropical Culicidae.vol. 2. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo; 1953b.

Marques CCA, Marques GRAM, Brito M, Santos-Neto LG, Ishibashi VC, Gomes FA. Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. Rev Saúde Pública 1993; 27 (4): 237-41.

Marcondes CB, Alencar J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. Rev Biomed 2010; 21: 221-238.

Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. Revista de Patologia Tropical 1998; 27 (1): 53-63.

Silva VC, Serra-Freire NM, Silva JS, Scherer PO, Rodrigues I, Cunha SP, Alencar J. Estudo comparativo entre larvitampas e ovitampas para avaliação da presença de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) em Campo Grande, Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42 (6): 730-731.