

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM AMOSTRAS DE *Aedes aegypti* COLETADAS EM DIFERENTES LOCALIDADES DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.

Thiago Luiz Brito Souza<sup>1,2</sup>  
Mariana Aragão Matos Donato<sup>1</sup>  
Duschinka Ribeiro Duarte Guedes<sup>2</sup>  
Constância Flávia Junqueira Ayres<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade Integrada de Pernambuco – FACIPE, UNIT, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Laboratório de Entomologia, Recife, PE, Brasil,

## RESUMO

As arboviroses representam um sério problema de saúde pública e são frequentemente associadas a surtos em seres humanos. Os arbovírus possuem sintomatologias clínicas parecidas, sendo facilmente confundidos, subestimando, pois, a circulação de novas espécies e abrindo lacunas para a ocorrência de novas epidemias. O presente trabalho tem como objetivo monitorar as amostras de *Aedes aegypti* em diferentes localidades do Estado de Pernambuco através da técnica de Duplex-Reverse Transcriptase-PCR, que possibilita a identificação dos principais arbovírus de importância médica pertencentes aos gêneros *Alfavírus* e *Flavivírus*. De um total de 725 mosquitos coletados, agrupados em 145 *pools*, foram detectadas 13 amostras positivas, das quais 10 pertencem ao gênero *Flavivírus* e 3 são *Alfavírus*. Foi detectada a circulação dos quatro sorotipos Dengue na cidade de Olinda. A taxa de infecção mínima (MIR) da Multiplex-Nested-PCR por 1000 fêmeas de *Aedes aegypti*, considerando apenas as amostras positivas e confirmadas, foi de 13,79. Estes dados indicam a circulação de diferentes arbovírus no Estado e demonstram a necessidade de um sistema de vigilância eficiente e contínuo para controlar a disseminação destes na população, uma vez que a principal forma de prevenção de epidemias se concentra, ainda, no controle de vetores.

**Palavras-chave:** Arboviroses, *Aedes aegypti*, Multiplex-PCR, Vigilância Entomológica.

## ABSTRACT

Arboviruses represent a serious public health problem and are often associated with outbreaks in humans. They have similar clinical symptomatology, being easily confused, underestimating therefore the circulation of new species and opening gaps for the occurrence of new outbreaks. This study aims to monitor samples of *Aedes aegypti* in different places within the State of Pernambuco by Duplex-Reverse Transcriptase-PCR technique, which enables the identification of the main arbovirus of medical importance belonging to the genera *Alphavirus* and *Flavivirus*. A total of 725 mosquitoes were collected and grouped into 145 pools, 13 positive samples were detected, of which 10 belong to the genus *Flavivirus* and 3 are *Alphavirus*. The circulation of the four Dengue serotypes have been detected in the city of Olinda. The minimum infection rate (MIR) of the multiplex-nested-PCR per 1,000 females of *Aedes aegypti*, considering only the positive and confirmed samples was 13.79. These data indicate the existence of different arbovirus in the state and demonstrate the need for an efficient and continuous monitoring system to control the dissemination of the population, since the main way of prevention of epidemics concentrates yet in vector control.

**Keywords:** Arboviruses, *Aedes aegypti*, Multiplex-PCR, Entomological Surveillance

## 1 INTRODUÇÃO

O termo Arbovírus (do inglês Arthropod-borne virus) não está incluído na classificação taxonômica de vírus, mas refere-se a um agrupamento com base na transmissão viral através de um inseto hematófago, como mosquitos e carrapatos, para um hospedeiro vertebrado. Esse vírus deve se replicar no vetor artrópode antes da transmissão, em vez de ser transmitido mecanicamente através de aparelhos bucais contaminadas (HERNANDEZ; BROWN; PAREDES, 2014). Os arbovírus são ecologicamente e epidemiologicamente distintos e estima-se que haja mais de 545 espécies conhecidas, dentre as quais, mais de 150 relacionadas com doenças em seres humanos, sendo a maioria zoonótica (CLETON et al., 2012).

Os arbovírus que causam doenças em humanos e em outros animais de sangue quente são membros de cinco famílias: Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae,

Reoviridae e Rhabdoviridae (RUST, 2012). Dentre esses, os grupos de maior interesse médico são pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Alfavirus*.

O gênero *Flavivirus*, membro da família Flaviviridae, compreende mais de 70 vírus, incluindo o vírus da dengue (DENV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da Encefalite de St. Louis (SLEV), vírus da febre amarela (YFV) e muitos outros (SMIT et al., 2011). A maioria dos flavivírus são agentes patogênicos causadores de doenças em humanos e responsáveis por grandes epidemias ocorridas globalmente. Estimativas recentes indicam que somente o vírus da Dengue é responsável por infectar 400 milhões de pessoas anualmente e mais de metade da população mundial vive em regiões endêmicas para esta doença debilitante e potencialmente fatal (BHATT et al., 2013; MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004). Como características dos flavivírus, eles são envelopados, possuem nucleocapsídeo contendo genoma RNA de fita simples e polaridade positiva com aproximadamente 11000 nucleotídeos (11 kb), que inclui uma pequena região 5' não-codificadora, uma cadeia aberta de leitura (ORF) e um terminal 3' não-codificador. A ORF codifica 3 proteínas estruturais (C, preM, E) e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A proteína não-estrutural 5 (NS5) é a maior (2700 nucleotídeos) e a mais conservada proteína do gênero *Flavivirus* e acredita-se que possua função de RNA-polimerase RNA-dependente (LINDENBACH, 2013).

O gênero *Alfavirus*, cuja transmissão se dá também por mosquitos, em especial os do gênero *Aedes*, inclui um grupo diverso de 29 espécies também causadoras de uma ampla gama de doenças em seres humanos e animais, com distribuição cosmopolita (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; POWERS, 2011). Dentre os *Alfavirus*, podemos destacar o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), o vírus Mayaro (MAYV), vírus da Encefalite Equina Ocidental e Oriental (WEEV e EEEV), vírus Aura (AURV) e o vírus Chikungunya (CHIKV) (COFFEY et al., 2013). São vírus de RNA de cadeia simples que pertencem à família Togaviridae (STRAUSS; STRAUSS, 1994). Em humanos, os sintomas de infecções por alfavírus variam de febre, erupção cutânea, náuseas e poliartrite a encefalite fatal. Embora a mortalidade dessas arboviroses seja baixa, quando associadas, podem ser debilitantes com sequelas clínicas e duração de meses a anos em alguns pacientes (WEAVER; LECUIT, 2015).

No Brasil, os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, devido a suas condições ecológicas favoráveis. Apesar da contínua e alta taxa de desmatamento, mais de um terço do território brasileiro ainda é coberto por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais, com flora e fauna extremamente diversificadas, as quais oferecem condições ideais para a existência de muitos arbovírus, mantidos em uma grande variedade de ciclos zoonóticos (FIGUEIREDO, 2007). Mais de 200 espécies diferentes de arbovírus foram isoladas no Brasil, e cerca de 40 deles causam doenças em humanos, tais como, vírus Mayaro (MAYV), vírus da encefalite equina oriental (EEEV), vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus da Encefalite de Sait-Louis (SLEV), vírus Dengue 1, 2, 3 e 4 (DENV), vírus da Febre Amarela (YFV), entre outros (IVERSSON et al., 1990; VASCONCELOS, 1998; WHO/PAHO, 2015).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que mais de 1,5 milhões de mortes por ano são acometidas por algum tipo de arbovirose (WHO, 2004). No segundo semestre de 2014, o vírus Mayaro foi detectado em amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue durante um surto no Mato Grosso, região Centro-Oeste do Brasil, o que corrobora com a importância de uma vigilância constante para as arboviroses em geral, devido à semelhança dos sintomas que as fazem serem confundidas tão facilmente (MOURAO et al., 2012; ZUCHI et al., 2014).

A emergência e reemergência das arboviroses são fenômenos naturais relacionados com a evolução e adaptação de espécies, associadas, ainda que indiretamente, ao comportamento humano (HOLLIDGE; WEISS; SOLDAN, 2011). Interferências antropogênicas, especialmente envolvendo composição e dinâmica do hospedeiro e da população do vetor e fatores ambientais, como rápidas mudanças climáticas, podem afetar substancialmente os sistemas naturais, levando a um aumento da circulação desses arbovírus para níveis de epidemia; além disso, o intenso fluxo de viagens de turismo e interações comerciais tem facilitado a propagação de arbovírus em todo o globo (HOLLIDGE; WEISS; SOLDAN, 2011; RUST, 2012). Ainda, somente no ano de 2015, o número de óbitos confirmados por dengue no país é de 693 até o momento, excluindo os casos ainda em investigação (SAÚDE, 2015b). Na ausência de uma vacina disponível comercialmente, com exceção da febre amarela, a prevenção dessas

arboviroses é focada primariamente no controle de mosquitos vetores, como o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (WILDER-SMITH, 2012).

Esse controle pode ser feito por métodos mecânicos o que inclui medidas de proteção pessoal, como o uso de mosquiteiros, telas, roupas, além do uso de armadilhas de oviposição para coleta de ovos e destruição de criadouros. Também como forma de controle, podemos destacar vigilância ativa de casos e do vírus, devendo ser realizada de forma contínua, principalmente nos períodos interepidêmicos, pois o vírus pode continuar circulando antes e depois da epidemia (MARCONDES, 2011). O monitoramento e identificação dos diferentes vírus de possível circulação, tanto em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica da doença, bem como em mosquitos coletados em campo ou através de armadilhas de oviposição constituem uma ferramenta importante na vigilância epidemiológica das arboviroses (DE MORAIS BRONZONI et al., 2005; GUEDES et al., 2010). Essas ações podem ser relevantes para determinar a magnitude e severidade das epidemias (TEIXEIRA et al., 2005), sobretudo, em lugares com intenso fluxo humano como Fernando de Noronha e outras localidades do Estado de Pernambuco.

Resultados prévios do nosso grupo obtidos através do monitoramento dos casos de dengue ocorridos em Fernando de Noronha desde 2011, por exemplo, sugerem a ocorrência de transmissão autóctone de dengue no local (BARBOSA, 2013), embora, o número de amostras de mosquitos positivas tenha sido menor que o esperado, uma vez que foi realizada uma coleta direcionada. Dessa maneira, há uma necessidade de um constante monitoramento na população de mosquitos, uma vez que a infecção vetorial é a principal forma de manutenção do vírus na natureza e também a vigilância entomológica pode mostrar a introdução de diferentes linhagens virais, o que determinará situações de risco para a ocorrência de novas epidemias em Pernambuco (GUEDES et al., 2010). Como prova disso, recentemente, a transmissão autóctone do CHIKV foi relatada pela primeira vez no Brasil e é atualmente epidemia com mais de 5.200 casos relatados autoctonia em todo o país até janeiro de 2015, dos quais Pernambuco já registra casos na capital do Estado, Recife, e nos municípios de Itaíba e Iati, no Sertão e Agreste pernambucano, respectivamente (SAÚDE, 2015b; WHO/PAHO, 2015).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo monitorar as amostras de

*Aedes aegypti* previamente coletadas no arquipélago de Fernando de Noronha e em diferentes localidades do Estado de Pernambuco para os principais arbovírus de importância médica através da técnica de Duplex-Reverse Transcriptase-PCR, que possibilita a identificação de arbovírus pertencentes aos gêneros *Alfavírus* e *Flavivírus*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

**2.1 Local de estudo** – A coleta dos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foi realizada em quatro localidades distintas dentro do estado de Pernambuco: o arquipélago de Fernando de Noronha (3° 51' N, 32° 25' W), a cidade de Olinda (8° 0' S, 34° 51' W) e São José do Egito (7° 28' S, 37° 16' W), e na cidade do Recife (8° 04' S, 34° 55' W), que incluiu o bairro de Sítio dos Pintos e o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM).

**2.2 Amostragem** – As coletas no arquipélago de Fernando de Noronha foram realizadas no período de Março a Junho de 2011 e Janeiro a Julho de 2012 conforme descrição em Barbosa (2013). A coleta das amostras de Sítio dos Pintos foi realizada no ano 2013 por aspiração nos ambientes intra e peridomiciliares seguindo a mesma metodologia de Sítio dos Pintos, no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães e em Olinda a coleta foi realizada em 2015. Nessas localidades, os mosquitos foram coletados com a utilização de um aspirador manual (modelo Horst) no intradomicílio e entornos de residências aleatórias das localidades de estudo. Na cidade de São José do Egito, realizada em agosto 2015, a captura dos espécimes seguiu a metodologia de coleta direcionada com a utilização do aspirador manual do tipo pequeno, modelo Horst, onde foram relatados casos suspeitos de dengue, confirmados ou não. Após a captura, os espécimes foram separados por sexo e localidade e armazenados em *pools* de cinco mosquitos, nos quais apenas mosquitos fêmeas foram considerados para o estudo. Posteriormente, esses *pools* foram estocados em um freezer -80° C, a fim de manter a integridade do material genético.

**2.3 Extração de RNA viral** - A extração de RNA das amostras de mosquitos foi realizada usando o reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com o protocolo do

fabricante com modificações conforme descrição por Guedes (2012). Após a extração, os RNAs foram tratados com DNase (Turbo DNase – Invitrogen) a fim de evitar contaminação das amostras com DNA genômico. Os RNAs previamente extraídos e tratados com DNase foram usados na técnica de transcrição reversa para obtenção do cDNA.

**2.4 Síntese do cDNA** - A técnica de transcrição reversa para obtenção do cDNA foi realizada utilizando a enzima Super Script® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) conforme descrito em Bronzoni (2005), com modificações. Em um volume final de 20 µl, foi usada a seguinte mistura: 1,0 µl de H<sub>2</sub>O, 4,0 µl de 5X First-Strand Buffer, 1,5 µl de DTT (1 mM), 2,0 µl de dNTP Mix (2 mM), 1,0 µl e 1,5 µl dos *primers* reverse cM3W (100 µM) e FG2 (10 µM), respectivamente, 0,5 µl de RNaseOUT (40 U/µl), 0,5 µl da enzima SuperScript III RT (200 U/µl) e 8,0 µl do RNA. Essa mistura final foi incubada em um termociclador (T3 Thermocycler, Biometra) programado para 1 ciclo de 50 °C por 1 hora e 1 ciclo de 70 °C por 15 min. Após a obtenção do cDNA, estes foram usados nas reações de Duplex-PCR com *primers* universais para os gêneros *Flavivírus* e *Alfavírus*.

**2.5 Duplex PCR** - A Duplex PCR para identificação dos gêneros *Alfavírus* e *Flavivírus* foi realizada conforme a descrição de Bronzoni et al. (2005) com adaptações. Em um volume final de 50 µl, foi utilizada a seguinte mistura: 27,3 µl de H<sub>2</sub>O, 5,0 µl do tampão 10X da enzima, 5,0 µl de dNTP (2 mM), 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,0 µl e 1,5 µl dos *primers* Fowards M2W (10 µM) e FG1 (10 µM), respectivamente, 0,20 µl DNA Taq polimerase (Platinum Taq DNA polymerase - Invitrogen) e 8,0 µl do cDNA. A mistura foi colocada em um termociclador (T3 Thermocycler, Biometra) programado para: 1 ciclo de 94°C por 2 min seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e ,por fim, 1 ciclo de 72 °C por 5 min. Os *primers* específicos de cada gênero foram selecionados para o anelamento de regiões conservadas do *Alfavírus* e *Flavivírus* produzindo *amplicons* de tamanhos distintos, 434 pb e 958 pb, respectivamente. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002 M, pH 8,3), corado com brometo de etídeo e fotografado em um transiluminador de ultravioleta.

**2.6 M-N-PCR (Multiplex Nested PCR)** - Com os *primers* específicos selecionados, duas M-N-PCR foram realizadas para cada amostra: a M-N-PCR-*Flavivirus* para identificação de DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DEN 4, e a M-N-PCR-*Alfavirus* para identificação de VEEV, EEEV, WEEV, AURAV e MAYV (Tabela 1) conforme a descrição de Bronzoni et al. (2005) com adaptações. No geral, a mistura de reação continha: 3,0 µl do produto da primeira amplificação (Duplex PCR), 5,0 µl do tampão da enzima (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 5,0 µl de dNTP (2 mM), 0,20 µl of Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase; Invitrogen) e H<sub>2</sub>O para completar um volume de 25 µl. Para a mistura de reação da M-N-PCR-*Flavivirus*, o *primer* forward FG1 foi adicionado simultaneamente a cada *primer* para DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4, numa concentração de 10 µM. Para a mistura de reação da M-N-PCR-*Alfavirus*, o *primer* reverse cM3W (100 µM) foi adicionado juntamente com os *primers* específicos para VEEV, EEEV, WEEV, AURAV e MAYV (50 µM). A mistura foi colocada em um termociclador (T3 Thermocycler, Biometra) programado para uma etapa inicial de 2 min a 94 °C, 25 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, e 72°C por 2 min. A etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris- Borato-EDTA (TBE), corado com brometo de etídeo e fotografado em um transiluminador de ultravioleta.

**Tabela 1:** Lista dos *primers* Espécie-Específicos selecionados para amplificação do DNA viral em espécimes de *Aedes aegypti* coletados em Pernambuco.

Ensaio	Primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)
M-N-PCR Flavivirus	nDEN1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472
	nDEN2	GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC	316
	nDEN3	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	628
	nDEN4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222
M-N-PCR Alfavirus	nMAY	GGAAGTTGGCCAAGGC	270
	nVEE	ACGGAGGTAGACCCATCCGA	400
	nEEE	CCACGGTACCGTTGCC	124
	nWEE	GGCGGCAGACCTGCTGGAA	208
	nAURA	TCAATGCACCTTCGACCA	86

DEN 1: Vírus Dengue Sorotipo 1, DEN 2: Vírus Dengue Sorotipo 2, DEN 3: Vírus Dengue Sorotipo 3, DEN 4: Vírus Dengue Sorotipo 4, MAY: Vírus Mayaro, VEE: Vírus da Encefalite Equina Venezuelana, EEE: Vírus da Encefalite Equina Oriental, WEE: Vírus da Encefalite Equina Ocidental, AURA: Vírus Aura.

**2.7 Taxa de infecção** - O cálculo da taxa de infecção viral nas amostras de mosquitos coletadas foi feito utilizando o cálculo de taxa de infecção mínima (MIR- Minimum Infection Rate). Este índice é calculado dividindo-se o número de *pools* infectados por espécie pelo número total de mosquitos testados para cada espécie, multiplicado por 1.000, conforme a descrição de Chow *et al* (1998).

### 3 RESULTADOS

No total, foram coletados 725 mosquitos da espécie *Aedes aegypti* agrupados em 145 *pools*, contendo cinco mosquitos em cada um. Dos 145 *pools* analisados, foram detectadas 13 amostras positivas, das quais 1 foi proveniente da cidade de São José do Egito, 10 de Olinda e 2 do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, conforme descrito na Tabela 2. As amostras reanalisadas provenientes de Fernando de Noronha, 11 *pools* no total, foram todas negativas. O mesmo ocorreu para as amostras de Sítio dos Pintos, das quais foram testados 65 *pools* e nenhuma delas foi positiva para os arbovirus testados.

**Tabela 2:** Número de arbovírus detectados em amostras de *Aedes aegypti* coletados em localidades de Pernambuco, agrupados em *Pools*\*.

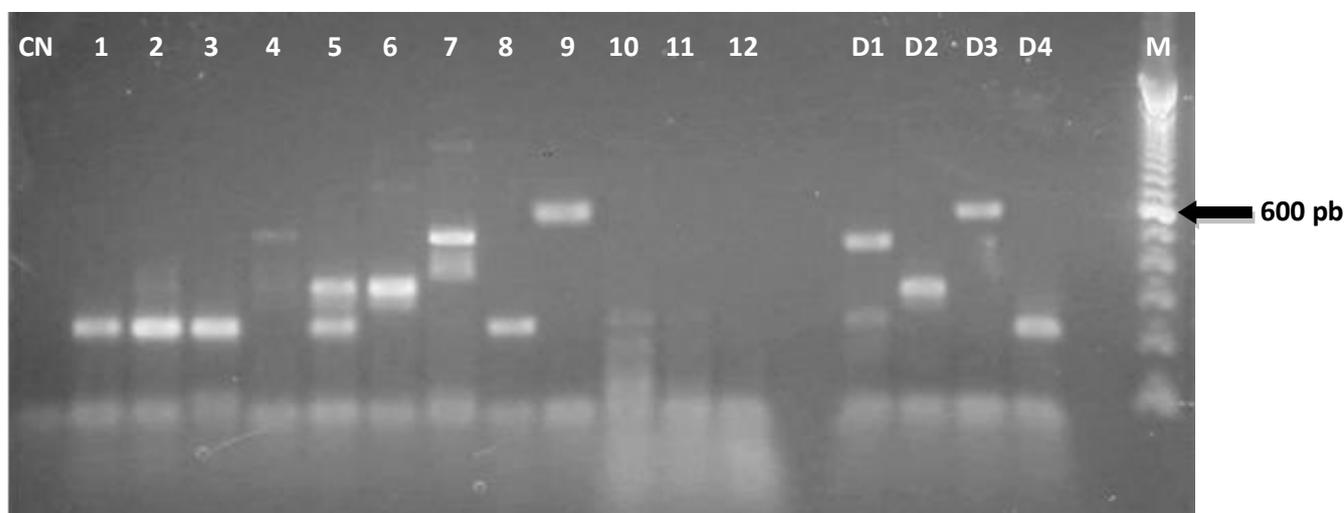
População	<i>Pools</i> Testados (%) <sup>y</sup>	Flavivírus (%) <sup>x</sup>				Alfavirus (%) <sup>x</sup>					Amostras Positivas
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	MAYV	VEEV	EEEV	WEEV	AURAV	
Fernando de Noronha <sup>a</sup>	11 (7,58) <sup>y</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
São José do Egito <sup>b</sup>	12 (8,27) <sup>y</sup>	-	-	-	1 (8,33) <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	1 (8,33) <sup>x</sup>
Olinda <sup>b</sup>	65 (44,82) <sup>y</sup>	1 (1,53) <sup>x</sup>	2 (3,07) <sup>x</sup>	1 (1,53) <sup>x</sup>	4 (6,15) <sup>x</sup>	-	-	-	2 (3,07) <sup>x</sup>	-	10 (15,3) <sup>x</sup>
Sítio dos Pintos <sup>c</sup>	48 (33,10) <sup>y</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães <sup>d</sup>	9 (6,20) <sup>y</sup>	1 (11,11) <sup>x</sup>	-	-	-	-	1 (11,11) <sup>x</sup>	-	-	-	2 (22,22) <sup>x</sup>
<b>Total</b>	<b>145</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>13 (8,27)<sup>y</sup></b>

\* Pool = 5 Mosquitos Fêmeas; DENV-1: Vírus Dengue 1, DENV-2: Vírus Dengue 2, DENV-3: Vírus Dengue 3, DENV-4: Vírus Dengue 4, MAYV: Vírus Mayaro, VEEV: Vírus da Encefalite Equina Venezuelana, EEEV: Vírus da Encefalite Equina Oriental, WEEV: Vírus da Encefalite Equina Ocidental, AURAV: Vírus Aura. <sup>a</sup> Distrito Estadual, <sup>b</sup> Município, <sup>c</sup> Bairro, <sup>d</sup> Instituição. (%)<sup>x</sup> Relação percentual com o número de *pools* respectivo à localidade correspondente; (%)<sup>y</sup> Relação percentual com o Total de *pools* Testados.

No presente estudo foi detectada a circulação dos quatro sorotipos para o vírus Dengue. Na cidade de Olinda foi verificado o maior número de amostras positivas das localidades analisadas, sendo detectadas 4 amostras para DENV-4, 2 amostras positivas para DENV-2 e 1 amostra positiva para DENV-1 e DENV-3. Nas localidades de São José do Egito e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, foram detectados os sorotipos Dengue tipo 4 e 1, respectivamente (Figura 1).

Das 13 amostras positivas, 10 pertencem ao gênero *Flavivirus* e 3 são *Alfavirus*. É importante ressaltar que as amostras positivas para o gênero *Alfavirus*, VEE e WEE, são apenas sugestivas, necessitando, pois, de testes de sequenciamento genético para confirmação viral. Portanto, considerando apenas as amostras positivas e confirmadas, 10 no total, a MIR da Multiplex-Nested-PCR por 1000 fêmeas de *Aedes aegypti*, foi de 13,79.

**Figura 1:** Visualização em gel de agarose 2% com produtos de amplificação de Multiplex-Nested-PCR para *Flavivirus* e *Alfavirus*



**Legenda:** CN: Controle Negativo da Reação. Poço 1, 2, 3, 5 e 8: DEN-4 (222 pb); Poço 4 e 7: DENV-1 (472 pb); Poço 5 e 6: DENV-2 (316 pb); Poço 9: DENV-3 (628 pb); Poço 10 e 11: WEEV (208 pb); Poço 12: VEEV (400 pb); M: Marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™).

## 4 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo monitorar os arbovírus circulantes em amostras de *Aedes aegypti* coletadas em diferentes localidades do Estado de Pernambuco através da técnica de Duplex-PCR seguida de Multiplex-PCR. Resultados do presente trabalho mostram a ocorrência dos quatro sorotipos do vírus Dengue e dois possíveis *alfavírus* no Estado. Em um estudo realizado em 2010 (GUEDES et al., 2010), os autores relataram a circulação simultânea de três dos quatro sorotipos de Dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) na Região Metropolitana do Recife. Nesse período de estudo, o sorotipo prevalente identificado em amostras humanas eram o DENV-3, enquanto que em mosquitos era detectado DENV-1 e DENV-2, sugerindo que esses vetores possam servir como um modo de manutenção para o vírus no meio ambiente e que, quando os níveis de imunidade da população para um determinado sorotipo começarem a diminuir, eles podem reemergir.

O DENV-2 é o sorotipo com a maior população efetiva em escala global, seguido pelo DENV-3, DENV-1 e DENV-4. O DENV-3 foi predominante na maioria dos estados brasileiros de 2002 a 2006, e, de 2007 a 2009, esta posição foi assumida pelo DENV-2. Depois de uma circulação discreta em 2009, o DENV-1 reemergiu na Região Sudeste, sendo detectado em 50,4% dos pacientes, seguido de 30,5% de DENV-2 e 19,1% de DENV-3. O DENV-4 teve uma circulação breve no Brasil em 1982, na região noroeste da Amazônia, em uma epidemia focal, e, em 2010, este sorotipo ressurgiu no Estado de Roraima, sendo, posteriormente, disseminado a diversas regiões do País (COSTA; VOLOCH; SCHRAGO, 2012; MOURAO et al., 2012).

A co-circulação de três sorotipos DENV foi registrada no estado de Pernambuco desde a introdução do DENV -3 em 2002, quando DENV -1 e DENV -2 já estavam presentes. O DENV - 3 tornou-se altamente predominante em 2005 e 2006, e um baixo percentual de amostras humanas infectadas com DENV-1 e DENV- 2 foi encontrado (CORDEIRO et al., 2007).

Desde a reintrodução de dengue no país na década de 80, no estado do Rio de Janeiro, as medidas de combate ao vetor e de vigilância laboratorial foram implementadas por meio do Programa de Vigilância Epidemiológica da Dengue, o

qual, no Estado de Pernambuco, foi criado em 1986. Apesar disso, esses esforços não tiveram êxito, uma vez que os primeiros registros de casos de infecção por DENV-1 no Estado datam desse mesmo ano, com a hipótese de terem sido importados dos Estados do Rio de Janeiro e Alagoas (CORDEIRO et al., 2007).

Os primeiros casos autóctones do vírus em Pernambuco foram confirmados em 1987, mas o surto foi controlado ainda no mesmo ano, com um intervalo de sete anos, com a presença do vetor e sem registro de casos, até a segunda epidemia em 1994, desta vez por DENV-2, cuja circulação passou a ser simultânea, apresentando uma predominância alternada entre eles (CORDEIRO et al., 2007; MOTA, 2001). Em 2002, encontrando uma população totalmente susceptível, instalou-se de forma explosiva a epidemia de DENV-3. Este sorotipo predominou no estado até o ano de 2008, quando voltou a aumentar o número de isolamentos do DENV-2. Nos anos de 2010 e 2011, o DENV-1 passou novamente a ser predominante (CORDEIRO et al., 2007; SAÚDE, 2015b). Com a introdução do DENV-4 em 2011, o estado passaria a ter em circulação os quatro sorotipos (SAÚDE, 2015a).

A detecção dos quatro sorotipos virais dengue na cidade de Olinda corrobora com a situação de circulação simultânea de todos os sorotipos virais desde o ano de 2011. Dados do Ministério da Saúde (2015b) apontam 1.416.179 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica (SE) 34, dos quais 73.401 estão concentrados em Pernambuco, com 12 óbitos, 15 com dengue grave e outros 49 em sinal de alarme. A prevalência observada para o sorotipo viral 4 na localidade de Olinda corrobora com os dados atuais de prevalência da doença em humanos no estado de Pernambuco, onde o DENV-4 também se apresenta em maior número. A mesma associação é ainda observada nos estados de Rondônia, Roraima, Pará, Distrito Federal e Rio Grande do Norte (SAÚDE, 2015b).

Dados do Ministério da Saúde (2015b) relatam uma prevalência de 93,4% para o sorotipo DENV-1 em âmbito nacional, no entanto, isso não foi observado no presente estudo, no qual o maior número de amostras positivas detectou o sorotipo DENV-4, apesar de ter sido identificado uma única amostra de DEN-1 na cidade Olinda. No entanto o amostra positiva para o DENV-4 na cidade de São José do Egito, juntamente com as detectadas em Olinda para o mesmo sorotipo, estão concordantes com a porcentagem de sorotipos confirmados no estado em

2015, o qual apresentou 34% de positividade para DENV-4. O DENV-3 identificado nas amostras do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães entra em segundo lugar na ordem decrescente de positividade para os Flavivírus.

O Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), lançado em julho de 2002 pelo Ministério da Saúde, para reforçar a vigilância epidemiológica no país, criou o Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA). Dados de Brasil (2015a), revelam que a cidade de São José do Egito apresentou um dos maiores índices do LIRAA no Estado de Pernambuco, com 14,1, ficando atrás apenas da cidade de Custódia, sendo, pois, classificado como situação de risco ( $4 \geq IIP$ ). Além disso, o ano de 2015 vem se configurando, até a semana epidemiológica 34, como a maior epidemia de dengue dos últimos 13 anos, quando da epidemia de DENV-3 no ano de 2002 no Estado; dados atuais revelam uma incidência 791,2 (/100 mil hab.), cujas cidades em destaque de risco são Custódia e São José do Egito, em ordem decrescente (SAÚDE, 2015b).

Segundo Costa (2009), a investigação das “taxas de infecção” (MIR) em mosquitos fornece informações sobre a circulação viral em determinadas localidades, antes que a doença esteja sendo transmitida em níveis mais elevados, possibilitando a implementação de medidas preventivas. Supõe-se que, quando há aumento da taxa de infecção do mosquito, o risco de transmissão de arbovírus também aumenta (CHIANG; REEVES, 1962). Este pressuposto baseia-se na proporção de mosquitos infectados, sendo uma boa aproximação da proporção de mosquitos infecciosos. Também requer estimativas viáveis da proporção de mosquitos infectados na população, no entanto, existem muitos fatores que podem invalidar esta suposição. Variação ambiental poderia introduzir imprevisibilidade em quantos mosquitos latentes sobrevivem para se tornar infeccioso, e a confiabilidade das taxas de infecção estimadas pode ser comprometida por interferentes durante a coleta mosquito e testes de vírus (BUSTAMANTE; LORD, 2010).

Com relação à taxa de infecção, o valor de 13,79 é relativamente baixo quando comparado a estudos anteriores que relataram circulação de no mínimo 3 sorotipos, como demonstrado em GUEDES et al. (2010). No entanto, as taxas de infecção em mosquitos coletados em campo variam muito entre os estudos, portanto, compará-las é extremamente complexo, uma vez que uma variedade de

fatores deve ser considerado, pois, o período de coleta (epidêmico e interepidêmico), tamanho do pool e o número amostras de processados exerce uma forte influência sobre o MIR em diferentes localidades (GU; LAMPMAN; NOVAK, 2004; GUEDES et al., 2010). Além disso, a baixa taxa de infecção obtida nesses estudos pode ser explicada pelo fato de que a MIR é calculada levando em consideração a hipótese que existe apenas um indivíduo infectado em cada pool positivo. Desse modo, há pode-se subestimar a positividade de mais de um mosquito do pool, sobretudo pelo elevado número de notificações de casos suspeitos de Dengue no Estado no mesmo período em que as coletas foram realizadas (SAÚDE, 2015b).

A detecção precoce de arbovírus em *Aedes aegypti* fornece informações úteis para a projeção do curso potencial de transmissão e para desvendar os fatores ambientais associados com a manutenção e criação de ciclos virais nos vetores. A detecção precoce também é fundamental, porque o tempo de atividade do vírus é importante para compreender os meandros da amplificação viral, bem como estender a janela para a intervenção.

Estudos realizados por REGIS et al. (2008) demonstram a presença tanto de *Aedes aegypti* quanto de *Aedes albopictus* na cidade de Recife, o que poderia aumentar as chances de transmissão de outros arbovírus. No entanto, apesar do Bairro de Sítio dos Pintos ter sido uma das localidades com maior número de amostras coletadas, não houve resultados positivos. Já a localidade de Fernando de Noronha, a ausência de resultados positivos não pode ser associada ao baixo número de amostras testadas, visto que na cidade de São José do Egito o mesmo não foi verificado. A hipótese mais plausível para explicar a não detecção de espécimes positivas no arquipélago pode estar relacionada com integridade do material testado, visto que já havia sido utilizadas por Barbosa (2013).

Outro resultado importante foi a possível identificação da circulação de dois *alfavírus*, VEE e WEE, no estado. No entanto, este resultado é apenas sugestivo, necessita-se ainda de análises que confirmem tal circulação, pois a epidemiologia destes ainda apresenta uma lacuna no que diz respeito ao monitoramento dos diversos arbovírus pertencentes a esse gênero, que possuem o mosquito *Aedes aegypti* como vetor e, sobretudo, são causadores de doenças em humanos.

Os produtos de amplificação detectados para o gênero Alfavírus em Olinda, sugerem a circulação do Vírus da Encefalite Equina Ocidental (WEEV). O WEEV já foi isolado no Brasil em vetores, na Floresta da Tijuca (Rio de Janeiro), e em algumas oportunidades foram encontrados anticorpos em equinos e humanos (RICHARTZ, 1994). O WEEV não está presente no Brasil, e no continente está presente no Canadá, EUA, México, Haiti, Guina, Argentina e Uruguai (SAÚDE, 2008). Nos EUA a doença é confinada quase exclusivamente aos estados da costa oeste e tem o *Aedes tarsalis* como vetor (THEILER; DOWNS, 1973). Apesar de ter sido identificado em outros vetores, não há relatos da detecção do vírus em *Aedes aegypti*. Os estudos de identificação do vírus não demonstraram a sua circulação em culicídeos, embora tenha sido detectados evidências sorológicas em aves e equinos (CALISHER et al., 1982; IVERSSON et al., 1990; RICHARTZ, 1994).

Diante disso, é crucial a realização de testes confirmatórios via sequenciamento genético para essa classificação viral além de realizar outras novas coletas na mesma localidade, pois a detecção de WEEV em Olinda seria a evidência dos primeiros casos do vírus em espécimes de culicídeos, pondo em estado de alerta para existência de surtos e epidemias.

A outra espécie pertencente ao gênero *alfavírus*, detectado no presente estudo, refere-se ao Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) encontrado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Esse subtipo viral, isolado na região amazônica em 1998, ocorre no sudeste do Brasil e provoca doença febril e diarreia em pessoas que visitam a Mata Atlântica (IVERSSON et al., 1990). O VEEV ocorre endemicamente na Colômbia e na Venezuela e é uma causa de epizootias e epidemias. Apesar de ser mantido num ciclo envolvendo roedores, pássaros e mosquitos da espécie *Culex* spp., podem eventualmente transmitir o vírus para os seres humanos, entretanto, há possibilidades de adaptação, a qual pode induzir uma amplificação secundária envolvendo equinos e algumas outras espécies de mosquitos, como o *Aedes aegypti* (WEAVER et al., 2004). Essa possibilidade adaptativa pode ser evidenciada caso seja confirmada por sequenciamento genético a amostra positiva para o VEEV, servindo como base de alerta para os órgãos encarregados em saúde pública na preocupação da emergência desse vírus no Estado, com o consequente risco de epidemias. A maior epidemia VEEV

da história ocorreu em 1969-1972, iniciada na Colômbia, se espalhou para o norte através da América Central, do México e do sul dos Estados Unidos, causando dezenas de milhares de casos humanos com centenas de mortes (BRAULT et al., 2004). Em 1995, um surto de VEEV afetou indivíduos na Venezuela e Colômbia, causando 1.300 casos de encefalite humana com uma taxa de letalidade de 10-15% (MESLIN, 1997). Ainda, relações comerciais estabelecidas entre o Brasil e os países do norte da América do Sul têm aumentado ao longo dos últimos anos, sendo assim, a recente construção de uma estrada ligando Manaus (Brasil) e Caracas (Venezuela), além de aumentar significativamente o comércio entre os dois países, pode oferecer uma nova rota para VEEV (FIGUEIREDO, 2007).

Segundo Gomes (2001), a vigilância entomológica pode ser entendida como a contínua observação e avaliação de informações originadas das características biológicas e ecológicas dos vetores, nos níveis das interações com hospedeiros humanos e animais reservatórios, sob a influência de fatores ambientais, que proporcionem o conhecimento para detecção de qualquer mudança no perfil de transmissão das doenças. Tem a finalidade de recomendar medidas de prevenção e controle dos riscos biológicos, mediante a coleta sistematizada de dados e consolidação no Sistema de Informação da Vigilância Ambiental em Saúde. Nessa perspectiva, o uso de transcrição reversa seguida pela reação de cadeia da polimerase (RT-PCR) na vigilância virológica do vetor pode contribuir na promoção de estratégias apropriadas de controle e, conseqüentemente, na prevenção de surtos e epidemias (BARBOSA, 2013).

## **5 CONCLUSÃO**

Estudos de vigilância entomológica têm ganhado cada vez mais destaque e se tornado exponencialmente importante quando se leva em consideração a necessidade de estratégias mais eficientes e eficazes no que diz respeito do controle de agentes infecciosos, sobretudo os que possuem o mosquito *Aedes aegypti* como fonte de transmissão. Os resultados obtidos a partir desse trabalho nos permite inferir sobre a atual situação epidemiológica dos arbovírus em circulação nas localidades do Estado de Pernambuco em que o estudo foi aplicado, uma vez que nos dá evidências da existência de espécies virais

veiculadas em espécimes de *Aedes aegypti*, pela detecção por metodologias moleculares. Com base nas inúmeras falhas que os atuais métodos de controle de vetores têm apresentado, é de extrema importância que haja um monitoramento constante da circulação viral. Nessa perspectiva, cabe aos profissionais da área de saúde o conhecimento da epidemiologia dos arbovírus, que na maioria das vezes apresentam sintomatologia semelhante ao DENV e por isso não são diagnosticados, principalmente, quando os sintomas ocorrem em períodos não epidêmicos. Faz necessária a implementação de um sistema de vigilância ativo, baseado na prevenção e controle de pacientes com doença febril aguda, reservatórios, animais domésticos e mosquitos vetores, a fim de monitorar a circulação no país e evitar que ocorra a introdução ou reintrodução destes vírus, o que poderia causar grandes epidemias.

## **6 SOBRE O TRABALHO**

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM - FIOCRUZ), Recife-PE, pelo Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) cujo financiamento foi feito pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Obtivemos parceria com a Secretaria de Saúde do Governo do Estado para a coleta de algumas amostras, além da colaboração de diversos colaboradores do próprio departamento e de outros do mesmo Centro de Pesquisa.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BARBOSA, P. P. *Detecção do vírus dengue em Aedes aegypti de Fernando de Noronha- PE*. 2013

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

BRAULT, A. C. et al. Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 31, p. 11344-11349, 2004.

BUSTAMANTE, D. M.; LORD, C. C. Sources of error in the estimation of mosquito

infection rates used to assess risk of arbovirus transmission. Am J Trop Med Hyg, v. 82, n. 6, p. 1172-1184, 2010.

CALISHER, C. H. et al. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. Am J Trop Med Hyg, v. 31, n. 6, p. 1260-1272, 1982.

CHIANG, C. L.; REEVES, W. C. Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. Am J Hyg, v. 75, p. 377-391, 1962.

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

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

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

CORDEIRO, M. T. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. Rev Soc Bras Med Trop, Brasilia, v. 40, n. 6, p. 605-611, 2007.

COSTA, C. A.; SANTOS, I. G.; BARBOSA MDA, G. [Detection and typing of dengue viruses in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the City of Manaus, State of Amazonas]. Rev Soc Bras Med Trop, v. 42, n. 6, p. 677-681, 2009.

COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. Infect Genet Evol, v. 12, n. 2, p. 309-314, 2012.

DE MORAIS BRONZONI, R. V. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. J Clin Microbiol, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

GOMES, A. Informe Epidemiológico do SUS. v. 122001.

GU, W.; LAMPMAN, R.; NOVAK, R. J. Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. Med Vet Entomol, v. 18, n. 2, p. 200-204, 2004.

GUEDES, D. R. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. J Vector Borne Dis, v. 47, n. 2, p. 67-75, 2010.

HERNANDEZ, R.; BROWN, D. T.; PAREDES, A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. Adv Virol, v. 2014, p. 259382, 2014.

HOLLIDGE, B. S.; WEISS, S. R.; SOLDAN, S. S. The role of interferon antagonist, non-structural proteins in the pathogenesis and emergence of arboviruses. Viruses, v. 3, n. 6, p. 629-658, 2011.

IVERSSON, L. B. et al. Relationship between the prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen and arbovirus in fishermen from the Ribeira Valley, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 32, n. 3, p. 215-220, 1990.

LINDENBACH, C. M. H. T. C. A. B. Fields Virology. 6. ed., 2013.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Rev Pan-Amaz Saude v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. Nat Med, v. 10, n. 12 Suppl, p. S98-109, 2004.

MARCONDES, C. Controle de artrópodes: princípios gerais. 2. ed. São Paulo, 2011.

MESLIN, F. X. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. Emerg Infect Dis, v. 3, n. 2, p. 223-228, 1997.

MOTA, M. Estudo da epidemia de dengue no estado de Pernambuco: Construção de um indicador composto de risco para a doença (Mestrado). 2001. 2001.

MOURAO, M. P. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. Vector Borne Zoonotic Dis, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.

POWERS, A. Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2011.

REGIS, L. et al. Developing new approaches for detecting and preventing Aedes aegypti population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.

RICHARTZ, R. Detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação para Alphavirus em soros de eqüinos do Estado do Paraná [dissertação]. 1994. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná. , 1994.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. Semin Pediatr Neurol, v. 19, n. 3, p. 130-151, 2012.

SAÚDE, M. D. Boletim epidemiológico Paulista. In: PAULO, P. D. V. D. Z. E. M. D. E. D. E. D. S. (Ed.). v. 5. n. 542008.

\_\_\_\_\_. Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012). In: SAÚDE, S. D. V. E. (Ed.)2015a.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Vigilância em Saúde (Dengue e Febre Chikungunya). Boletim epidemiológico 28. In: SAÚDE, S. D. V. E. (Ed.)2015b.

SMIT, J. M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. Viruses, v. 3, n. 2, p. 160-171, 2011.

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

TEIXEIRA, G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? Cad Saude Publica, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.

THEILER, M.; DOWNS, W. The Arthropod-borne viruses of vertebrates. New Haven, Yale University, 1973.

TRAVASSOS et al. Manual de procedimentos técnicos para coleta de amostra e diagnóstico laboratorial das encefalomyelites equinas. In: CHAGAS., L. D. A. D. I. E. (Ed.). Belém - PA1992.

VASCONCELOS, P. F. C. T. D. R., AMELIA P. A; PINHEIRO, FRANCISCO P; SHOPE, ROBERT E; DEGALLIER, NICOLAS; TRAVASSOS DA ROSA, ELIZABETH S. Arboviruses pathogenic for man in Brasil. p. 72-99, 1998.

WEAVER, S. C. et al. Genetic determinants of Venezuelan equine encephalitis emergence. Arch Virol Suppl, n. 18, p. 43-64, 2004.

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

WHO, W. H. O.-. The world health report 2004 - changing history. 2004.

WHO/PAHO, W. H. O. P. A. H. O.-. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2013-2015. 2015.

WILDER-SMITH, A. Dengue infections in travellers. Paediatr Int Child Health, v. 32 Suppl 1, p. 28-32, 2012.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 109, n. 6, p. 820-823, 2014.

## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO - TCC

Ao 13º. dia do mês de novembro de 2015, às 13h, no auditório da Faculdade Integrada de Pernambuco - FACIPE, campus Saúde, o aluno **Thiago Luiz Brito Souza**, defendeu, perante Banca Examinadora, o Trabalho de conclusão de Curso intitulado **Identificação molecular de arbovírus em amostras de *Aedes aegypti* coletadas em diferentes localidades do estado de Pernambuco, Brasil**, para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina. A avaliação pela Banca Examinadora, formada pelos Professores **Mariana Aragão Matos Donato, Alicely Araújo Correia e Mariana Carolina de Moraes Sobral** para o aluno foi 10,0, sendo assim, considerado o aluno APROVADO pela Banca Examinadora. A nota do aluno foi condicionada à entrega do trabalho, com as devidas alterações até a data de 23 de novembro de 2015, até às 20 h.

Assinatura do (a) Professor (a) 1º Examinador (a) / Presidente:

Mariana A. M. Donato

Assinatura do (a) Professor (a) 2º Examinador (a):

Alicely Araújo Correia

Assinatura do (a) Professor (a) 3º Examinador (a):

Mariana Sobral

**Obs.:** O trabalho definitivo, com as devidas alterações sugeridas pela Banca Examinadora, deverá ser entregue duas cópias da versão corrigida do Trabalho de Conclusão de Curso, em formato de PDF e com as devidas assinaturas, em um CD identificado na biblioteca da unidade de Saúde – Caxangá e outro CD identificado na coordenação do curso.