



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARÍLIA ANDREZA DA SILVA FERREIRA

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS NO COMBATE DE *Aedes aegypti* E
INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE TRÊS ARBOVIROSES EM UM BAIRRO DE
PATOS-PB

Recife

2018

MARÍLIA ANDREZA DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS NO COMBATE DE *Aedes aegypti* E
INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE TRÊS ARBOVIROSES EM UM BAIRRO DE
PATOS-PB**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, Área de
Concentração Biotecnologia, da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de mestre
em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ederson Akio Kido

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia – CRB4-/1788

Ferreira, Marília Andreza da Silva

Avaliação de estratégias no combate do *Aedes aegypti* e investigação do surto de três arboviroses em um bairro de Patos - PB / Marília Andreza da Silva Ferreira. – 2018.

144 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ederson Akio Kido. Coorientador: Prof.
Dr. Paulo Paes de Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Arboviroses. 2. *Aedes aegypti*. I. Kido, Ederson Akio (Orientador). II.
Andrade, Paulo Paes de (Coorientador). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

MARÍLIA ANDREZA DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS NO COMBATE DE *Aedes Aegypti* E
INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE TRÊS ARBOVIROSES EM UM BAIRRO DE
PATOS-PB**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, Área de
Concentração: Biotecnologia, da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de mestre
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/07/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Éderson Akio Kido

Departamento de Genética-Centro de Biociências/UFPE (Orientador)

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto

Departamento de Genética-Centro de Biociências/UFPE (Titular externo)

Dr^a. Alzira Maria Paiva de Almeida

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (Titular interno)

Dr^a. Valesca Pandolfi

Departamento de Genética-Centro de Biociências/UFPE (Suplente interno)

Dr. Manassés Daniel da Silva

Departamento de Genética-Centro de Biociências/UFPE (Suplente externo).

Dedico este trabalho à todas as
pessoas que acreditaram e o
tornaram possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e força para desenvolver e concluir esse trabalho. Toda honra e glória ao Senhor!

A minha família, por ser porto seguro: a meus pais, Arlindo e Imaculada, às minhas irmãs, Mirele e Mariane.

Ao meu namorado Selismar, pelo carinho, companhia e dias que abdicou de seu serviço para ajudar na confecção de armadilhas e trabalho de campo.

Ao orientador Ederson Akio Kido, por aceitar orientar esse trabalho, ensinar, fornecer os recursos humanos e infraestrutura para o trabalho molecular, por compreender minhas ausências e por manter a coesão e unidade desse trabalho, sempre com contribuições valiosas.

A Paulo Paes de Andrade, coorientador e amigo pessoal, por me conduzir pelo braço, ensinar, instigar a busca pelo conhecimento, pelo incentivo psicológico, material e físico. Creio que qualquer frase escrita aqui seja incapaz de demonstrar meu carinho, agradecimento e eterna gratidão. Ele me apresentou o bicho Fau, que é o grande mentor desse trabalho, responsável pela motivação e alegria quando o horizonte escurecia por qualquer razão.

À banca, pela aceitação do convite e pelas contribuições.

Agradeço a professora Marcia Melo, por ceder a infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, na UFCG e a todos os que compõem este laboratório, especialmente: Raizza, Laysa, Saul, Beatriz e Heitor.

Aos 400 moradores e participantes do projeto das Armadilhas de *Aedes*, pela boa vontade em nos receber, atenção, carinho, ensinamentos e apoio que nos foram cedidos.

À Prefeitura de Patos, pela parceria e por disponibilizar agentes comunitários de endemias, nossos canais de comunicação com a população. Aos agentes Raniery e Ernailson, meu muito obrigado!

Aos integrantes do projeto Armadilhas de *Aedes*, pelas incontáveis visitas ao bairro Mutirão. Sem seu apoio, isso não teria saído do papel: Emília, Érika, Norma, Ideraldo, Jonilson, Guilherme e minha querida irmã Mirele.

Ao PPGCB, pela oportunidade de concluir essa importante etapa de minha formação, aos professores que o compõem e a secretária Adenilda, que contribuiu na oportunidade de conciliar trabalho e estudo.

Ao LGM, cujos integrantes foram companhia nos dias de trabalho em Recife. Esses meninos fazem ciência: Marislane, Manassés, George, Katia, Gisele, Fernanda, Amanda, Neto, Raisal, Valquíria, Jorge, Vinicius, Elvson e Natália. Em especial, agradeço a Marislane e Manassés, por ajudarem na extração de DNA e nas PCRs.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, mais especificamente ao Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores e ao Departamento de Entomologia por fornecer as larvas de *Aedes*.

Aos colegas de trabalho do CFP/UFCG, pela compreensão na reta final desse trabalho.

À Capes, pela bolsa concedida por oito meses e a Target DNA pelo financiamento das despesas pessoais e de pesquisa durante oito meses desse mestrado.

À Vigilância Epidemiológica de Patos pela parceria e concessão dos dados de notificação.

À Vigilância Ambiental, pelas contribuições no trabalho de campo. Gorete e Argemiro, muito obrigada!

Ao professor Sérgio, pela parceria de trabalho no tratamento estatístico da avaliação de armadilhas.

Aos amigos que tornaram a vida em Recife mais colorida: Cecília, Wendell e Jonathas. Sem dúvidas, essa cidade seria muito triste sem vocês!

Aos meus amigos, que estiveram encorajando cada passo meu na vida profissional e pessoal: Ewerton, Luiz, Anderson, Jailton, Edna e Ugo. Levá-los-ei sempre comigo.

Em uma epidemia, um bom gestor
pode salvar mais vidas que um
clínico.

Erick Martínez

RESUMO

O Brasil viveu uma tríplice epidemia viral de dengue, zika e chikungunya em 2016 transmitidas pelo *Aedes*. Diante disso, há necessidade de avaliação das estratégias de controle em uso e outras que despontam no cenário. O objetivo deste trabalho é a avaliação da efetividade de algumas estratégias e ferramentas auxiliares no combate de *Aedes aegypti*, a saber: armadilhas plásticas para controle de populações intradomiciliares de *Aedes*; ferramentas moleculares de detecção molecular de vetores e identificação das duas principais espécies em pools de larvas; o cenário regulatório de insetos transgênicos; e adicionalmente, a investigação de provável subnotificação no surto de três arboviroses numa localidade da Paraíba. As armadilhas foram testadas quanto a eficácia em reduzir a densidade intradomiciliar de *A. aegypti* no bairro Nova Conquista em Patos, PB durante 13 semanas, em duas quantidades diferentes por casa, enquanto ovitrampas monitoraram as flutuações por meio de oviposição na área estudada e na área controle. A detecção molecular consistiu de análise *in silico* de primers pré-publicados, testes de extração de DNA com CTAB e experimentos de PCR em diluições seriadas de misturas de *A. aegypti* e *A. albopictus* para identificação das duas espécies em pool de larvas. A subnotificação foi investigada por meio de inquérito epidemiológico e posterior comparação com os registros oficiais. A avaliação dos insetos transgênicos foi realizada à luz do regulatório brasileiro, considerando a avaliação de risco, o empoderamento das partes interessadas e o processo de tomada de decisão. A análise estatística mostra que as armadilhas não reduzem a densidade de vetores. Na detecção molecular, o protocolo foi otimizado e avaliado quanto a especificidade, sensibilidade e aplicação prática. A análise dos dados do inquérito epidemiológica e SINAM indica que houve grande subnotificação das três arboviroses em 2016. A avaliação de insetos transgênicos indica que a lei de Biossegurança assegura a avaliação segura de um novo evento, a presença de mecanismo letal na variedade de *Aedes aegypti* transgênica considerada evita prováveis dispersões indesejadas e a comunicação de risco é necessária para a aprovação do público. Por outro lado, a armadilha plástica não foi capaz de reduzir populações intradomiciliares de *Aedes*, a detecção molecular é capaz de detectar o DNA de mosquitos na concentração de 50 pg/microlitro em pool

de larvas, o regulatório brasileiro está apto para avaliar e liberar insetos com potencial em Saúde Pública e houve subnotificação das três arboviroses, sendo prejudicial para o delineamento de novas ações de controle.

Palavras-chave: Culicídeo vetor. Armadilha. Transgenia. Detecção Molecular. Subnotificação.

ABSTRACT

Brazil experienced a triple viral epidemic of dengue, zika and chikungunya in 2016 transmitted by the *Aedes* mosquitoes. Given this, there is a need to assess control strategies in use and others that emerge in the scenario. The objective of this work is the evaluation of the effectiveness of strategies and auxiliary tools in the control of *Aedes aegypti*, namely: plastic traps for *Aedes* control, molecular tools for molecular detection of this mosquito species and identification of both *A. Aedgypti* and *A. Albopictus* in mixtures of the larval stages, the regulatory scenario of transgenic insects and, additionally, subnotification in the outbreak of three arboviruses. The traps were tested for efficacy in reducing the intradomicillary density of *A. aegypti* in the neighborhood of Nova Conquista in Patos, PB for 13 weeks in two different amounts, while ovitraps monitored fluctuations through oviposition in the studied area and in the control area. Molecular detection consisted of in silico analysis of the primers, DNA extraction tests with CTAB and PCR experiments in serial dilutions of mixtures of *A. aegypti* and *A. albopictus* to identify the two species in pooled larvae. Underreporting was investigated through epidemiological inquiry and subsequent comparison with official records. The evaluation of transgenic insects was carried out in the light of the Brazilian regulations, considering the risk assessment, the stakeholders' empowerment and the decision-making process. Statistical analysis shows that traps do not reduce vector density. The protocol for vector molecular detection was optimized and evaluated for specificity, sensitivity and practical application. Analysis of the data from the epidemiological survey and SINAM indicate that there was a large underreporting of the three arboviruses in 2016 for the area studied, which mirrors similar deficiency in other parts of Brazil and in the World. The evaluation of transgenic insects indicates that the Brazilian Biosafety law ensures the safe evaluation of a new event, the presence of a lethal mechanism avoids probable unwanted dispersions and the risk communication is required for public approval. On the other side, the plastic trap was unable to reduce intradomiciliary *Aedes* populations. Moreover, the molecular detection is able to detect mosquito DNA at a concentration as low as 50 pg / microliter in larval pools. Additionally, the Brazilian regulatory is apt to evaluate and release

transgenic insects with potential use in public health. And finally, there was a large underreporting of the three arboviruses infections, being detrimental to the design and undertaking of control actions.

Keywords: Culicid vector. Trap. Transgenesis. Molecular Detection. Subnotification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Aedes</i>	24
Figura 2 - Respiração de larvas de <i>Aedes</i>	25
Figura 3 - Classificação Taxonômica de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	26
Figura 4 - Histórico do <i>Aedes</i> no Mundo e No Brasil	27
Figura 5 - Métodos de controle de <i>Aedes</i>	31
Figura 6 - Armadilhas utilizadas para abordagens em massa para controle de <i>Aedes</i>	32
Figura 7 - Quadro com comparação de métodos de levantamento de índices entomológicos	41
Figura 8 - Representação do nível de subnotificação de Dengue	44
Figura 9 - Histórico da doença no Mundo e Brasil	45
Figura 10 - Distribuição espacial dos casos notificados e confirmados de chikungunya no Brasil até agosto de 2016.....	45
Figura 11 - Distribuição temporal das notificações de zika no Brasil.....	47
Figura 12 - Submissão de um projeto de OGMs para avaliação de risco pela CTNBIO.....	49
Figura 13 - Matriz de cálculo do risco representado por um OGM	50

ARTIGO

Figure 1 - Representation of the area with high <i>Aedes aegypti</i> density in the Nova Conquista neighborhood, Patos city, Paraíba state, Brazil. The numbers indicate the blocks included in this study. Houses in blocks 18, 21, 22, 23 and 24 had both PET traps and ovitraps installed, houses in blocks 6, 7, 13, 16 17 19 and 20 only ovitraps and block 21 had both control and sample houses.	57
Figure 2 - PET trap. The top cone of a 2L bottle is cut, inverted and glued to its bottom. An additional bottleneck is installed on the side wall for water supply.	

The funnel resulting from inverting the bottle is painted black and made rough by adding fine sand. A nylon organza screen was installed in the inverted bottleneck to prevent the return of larvae to the funnel59

ARTIGO 2

Box 1 - Main responsibilities and functions of the National Biosafety Technical Committee (CTNBio)79

Figure 01 - Relations between the main components involved in the Brazilian regulatory system80

Figure 02 - Maps showing the positioning of the main stakeholders that influenced the process of construction of the biotechnology laws implemented in Brazil in 1995 and, subsequently, in 200583

Figure 03 - Diagram presenting the methodology of risk assessment of GMOs, with its five stages84

ARTIGO 4

Figura 1 - Teste de sensibilidade para a PCR otimizada para a partir de diluição seriada do DNA para *Aedes aegypti*. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando resultado da amplificação de DNA foi diluído a partir de 500 ng e incubado em reação de PCR de 20 ng. Foi utilizado o DNA *marker* (Ludwig-Biotec) de 1kb, representado a direita (0,5; 1; 2; 3 e 5 kpb). Neg: Controle negativo, sem DNA113

Figura 2 - Teste de sensibilidade para a PCR otimizada para a partir de diluição seriada do DNA para *Aedes albopictus*. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando resultado da amplificação de DNA foi diluído a partir de 500 ng e incubado em reação de PCR de 20 ng. Foi utilizado o DNA *marker* (Ludwig-Biotec) de 1kb, representado a direita (0,5; 1; 2; 3 e 5 kpb). Neg: Controle negativo, sem DNA 113

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Egg counts in ovitraps from houses with PET traps (P) or without them (O), during 9 weeks (Roman digits), according to the block and house (Quart. SMS), in the Nova Conquista community, city of Patos, PB, Brazil.....	62
Table 2 - Egg counts in ovitraps from houses with PET traps (P) or without them (O), during 4 weeks – second phase - (Roman digits), according to the block and house (Quart, SMS), in the Nova Conquista community, city of Patos, PB, Brazil.....	62

ARTIGO 3

Table 1 - Information obtained via questionnaire answers from 343 residents of 90 houses in Nova Conquista neighborhood, Patos/PB, between January and June of 2016.....	96
Table 2 - Distribution of the three arboviral infections among residents of the Mutirão neighborhood (Nova Conquista), Patos, PB, Brazil, between January and June of 2016	97
Table 3 - Categories, determinants and causal factors of underreporting	99

ARTIGO 4

Tabela 1 - Estudos realizados para detecção molecular de espécies do gênero <i>Aedes</i>	110
Tabela 2 - Médias das concentrações de DNA (ng/µl) obtido de larvas de <i>Aedes</i> (no mínimo três extrações), em volume final de 30 µl	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	- Agente Comunitário de Endemias
ACS	- Agente Comunitário de Saúde
BG-GAT	-Biogents - Gravid Aedes Trap
CDC-AGO	-Center for Diseases Control and Prevention-Autocidal Gravid Ovitrap
CNBS	- Conselho Nacional de Biossegurança
CNBS	-Conselho Nacional de Biossegurança
CONEP	-Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CTAB	-Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
CTNBIO	- Comissão Técnica de Biossegurança
DNA	-Deoxyribonucleic Acid
EF	-Expansion Factor
INMETRO	-Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ITS	-Internal Transcribed Spacer
LIRAA	- Levantamento de Índice Rápido de <i>Aedes aegypti</i>
ng	-Nanograma
OGM	- Organismo Geneticamente Modificado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	-Polymerase Chain Reaction
PET	-Poli(Tereftalato de Etileno)
RNA	-Ribonucleic Acid
SINAN	- Sistema de Informação de Agravos de Notificação
UFPE	-Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo Geral	20
1.1.2 Objetivos Específicos	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 O GÊNERO <i>Aedes</i>	21
2.1.1 A espécie <i>A. aegypti</i>	25
2.1.2 A espécie <i>A. albopictus</i>	26
2.2 CONTROLE DE <i>Aedes</i>	27
2.2.1 Métodos ambientais	29
2.2.2 Métodos mecânicos	30
2.2.2 Métodos biológicos	35
2.2.3 Métodos químicos	36
2.3 AÇÕES INTEGRADAS DE CONTROLE DO <i>A. Aegypti</i>	37
2.4 VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA	38
2.5 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	39
2.5.1 Arboviroses transmitidas pelo <i>Aedes</i>	40
2.6 AVALIAÇÃO DE RISCO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMS)	45
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	49
4 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BMC PROCEEDINGS	114
ANEXO A – NORMAS DA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ	128
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA BMC PROCEEDINGS	131
ANEXO C – NORMAS DA REVISTA BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION	140

1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos do gênero *Aedes* spp. são culicídeos exóticos no Brasil, de grande importância epidemiológica e de distribuição cosmopolita. Dentre as várias espécies do gênero, o *A. aegypti* e o *A. albopictus* se destacam na área médica. O controle do *A. aegypti* no Brasil tem constituído um importante desafio há mais de um século. Mesmo considerando situações em que os recursos destinados ao controle do vetor sejam apropriados para a efetivação de programas, muitas vezes não se tem alcançado sucesso, como pôde ser evidenciado pela tríplice epidemia viral, em 2016. Além do *A. aegypti*, o *A. albopictus* também merece atenção dos serviços de vigilância, pois é um vetor reconhecido em outros países, e em experimentos laboratoriais, mostrou-se capaz de transmitir pelo menos 22 tipos de arboviroses.

Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas como alternativas no controle do *A. aegypti*, utilizando-se diferentes mecanismos de ação, como monitoramento seletivo da infestação, emprego de armadilhas e outras iniciativas ecológicas, medidas sociais, dispersão de inseticidas, novos agentes de controle biológico e técnicas moleculares para controle populacional dos mosquitos, considerando-se também a combinação entre elas. As tecnologias em desenvolvimento demandam avaliação da eficácia, viabilidade e custos para implementação como estratégias complementares às ações já preconizadas pelas Diretrizes Nacionais de Controle da Dengue.

O controle do *A. aegypti* oferece a vantagem de abordar simultaneamente o controle de todas as doenças transmitidas pelo mesmo vetor (dengue, chikungunya, febre amarela e zika, entre outras). De fato, é mais lógico e produtivo combater o vetor do que inúmeras doenças ao mesmo tempo, reduzindo as chances de novas epidemias.

Armadilhas plásticas têm sido propostas para monitoramento e controle populacional de *Aedes* spp. Embora as intervenções de armadilhas em massa tenham sido creditadas como ineficientes, em comparação com aplicações de inseticidas, os níveis crescentes de resistência aos produtos químicos utilizados e o desenvolvimento de armadilhas acessíveis que capturam e matam fêmeas de mosquitos mostram uma grande promessa. Várias armadilhas que impedem a saída dos adultos derivados dos ovos nelas

depositadas também têm sido propostas, mas não há uma avaliação criteriosa da eficácia, o que dependerá de muitos fatores diretamente ligados à biologia do vetor.

A vigilância epidemiológica, por sua vez, tem importante papel na determinação das ações de controle, pois diante dos dados gerados, o início e a intensidade de uma epidemia determinam a resposta da gestão em saúde. Sua eficácia é afetada por diversos fatores, incluindo a ausência de registros nos sistemas oficiais. A subnotificação é o principal empecilho ao bom planejamento e à execução de ações efetivas de controle e traz grandes prejuízos à população.

A implementação de ações que reduzam o risco de aparecimento de situações críticas requer um sistema de vigilância entomológica eficiente, com métodos sensíveis para detectar mudanças na distribuição e abundância do vetor em tempo real. A vigilância entomológica baseia-se no Levantamento de Índice Rápido de *A. aegypti* (LIRAA), baseado na pesquisa larvária em imóveis, através de busca ativa realizada pelos agentes de endemias em todo o país. O trabalho de campo é complementado pelo trabalho dos técnicos em laboratório, que realizam a identificação morfológica e contagem dos espécimes. Métodos moleculares podem agilizar o procedimento, podendo ser úteis em períodos de crise, sobretudo na detecção precoce de uma nova espécie vetora.

O mosquito *A. aegypti* é de fato um grave problema de saúde pública no Brasil, e o município de Patos, na Paraíba, representa de forma quase completa a problemática da doença, como indicam os índices do LIRAA, que configuram a dengue como doença endêmica, com ciclos epidêmicos no município. Além disso, a localização da cidade contribui para a dispersão da doença para outros locais, por ser uma cidade pólo, elo comercial de inúmeras rotas, próxima territorialmente de outros Estados, podendo facilmente receber a doença de outros locais ou transmitir para viajantes. Apesar das medidas sistemáticas de controle, vários bairros estão com índices de infestação alarmantes. O bairro Nova Conquista é um bairro com LIRAA considerado de alto risco e, por isso, foi escolhido para a presente pesquisa, com média de 5.0 nos últimos anos.

Entre as metodologias promissoras que despontam no cenário do controle do *Aedes*, estão a engenharia genética, a edição gênica e a biologia

sintética, entre outras. Essas metodologias necessitam de avaliação quanto a sua segurança, eficácia e estabilidade no ambiente. Em relação à biossegurança, o Brasil possui legislação específica para transgênicos, mas discussões acerca de novas tecnologias advindas do progresso da ciência, que não são definidas como transgenia, são necessárias. É importante verificar se o arcabouço do regulatório brasileiro está estruturado para tais eventos, além do reconhecimento das atribuições das partes envolvidas, para que novas estratégias de controle do *Aedes* possam ser utilizadas sem conflitos sociais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral dessa dissertação é a avaliação das estratégias de controle dos vetores do gênero *Aedes* no Brasil, tanto do ponto de vista técnico como regulatório, apontando viabilidade, dificuldades e possíveis soluções e comparando o cenário brasileiro com o de outros países endêmicos para as arboviroses em pauta.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

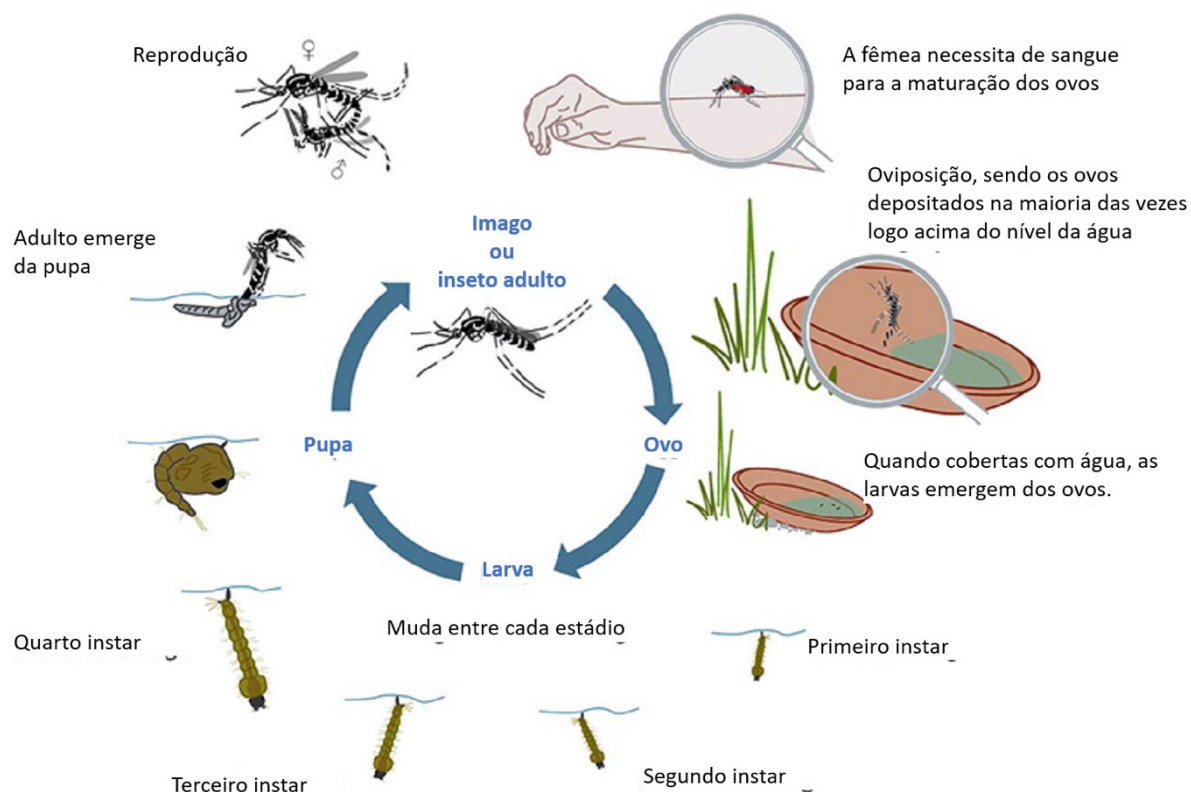
- a) Avaliar a eficácia de armadilhas plásticas letais na redução da densidade intradomiciliar de mosquitos do gênero *Aedes*;
- b) Estimar a subnotificação do surto de dengue, zika e febre Chikungunya em um bairro de Patos (PB) e compreender as causas da subnotificação durante o período de um surto;
- c) Avaliar o cenário regulatório brasileira frente às novas tecnologias que despontam no cenário de *Aedes* transgênico;
- d) Otimizar metodologias para identificação de *A. aegypti* e *A. albopictus* em pool de larvas voltadas para a realidade em Saúde Pública.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O controle de *Aedes* envolve diversas abordagens e nessa revisão estão relatados apenas alguns aspectos do assunto. Cada um desses tópicos está relacionado a compreensão do assunto e estão abordados novamente em cada artigo apresentado neste trabalho. Os temas aqui apresentados são biologia e controle de vetores do gênero *Aedes*, aspectos de vigilância entomológica, vigilância epidemiológica e regulatório de organismos geneticamente modificados.

2.1 O GÊNERO *AEDES*

Os culicídeos que compõem o gênero *Aedes* são insetos holometábolos e se desenvolvem em coleções de água. O ciclo de desenvolvimento do *Aedes* spp. engloba a fase de ovo, quatro fases larvárias (L1, L2, L3 e L4), fase de pupa e fase de adulto e pode durar de sete a dez dias (Figura 1). Alguns fatores como nutrição, temperatura, fotoperíodo e umidade podem influenciar na duração desse ciclo (CDC, 1979; FORATINNI, 2002; OECD, 2018).

Figura 1 : Ciclo de vida de *Aedes*.

Fonte: O autor (2018) com dados de Biogents® (2018).

Os ovos são alongados, fecundados no momento da postura; inicialmente esbranquiçados, escurecem rapidamente (BRASIL, 2001). São depositados nas paredes internas dos criadouros, resistem à dessecação e sobrevivem por até 450 dias, até que as condições adequadas para o desenvolvimento estejam disponíveis (diapausa) (FORATTINI, 2002). Os ovos representam um ponto crítico para o controle de doenças, pois mantêm o vetor em um local mesmo diante de condições adversas. A transmissão transovariana é a passagem de vírus da fêmea infectada para os ovos, que possibilita a eclosão de novas fêmeas contaminadas. É um mecanismo conhecido em doenças como dengue (GUEDES, 2006; SATOTO et al., 2018), zika (LI et al, 2017) e chikungunya (ZYTOUN et al., 1993; NIYAS et al., 2010).

As larvas alimentam-se de material orgânico, movimentam-se em forma de S, como uma serpente, são fotofóbicas e sensíveis a movimentos na água. As passagens entre os estágios larvais dependem de temperatura, densidade larvária no mesmo criadouro e disponibilidade de alimento. Alimentam-se

através de filtração, mecanismo utilizado para uso de larvicidas orais (BRASIL, 2001). Para respirar, a larva vem à superfície, onde fica em posição quase vertical, como mostrado na Figura 2.

Figura 2: Respiração de larvas de *Aedes*.



Fonte: WHO, 2017.

As pupas possuem formato de vírgula, não se alimentam e flutuam na superfície da água, facilitando a emergência da fase alada. A duração da fase pupal pode ser influenciada pelas condições externas do ambiente, como a temperatura. A passagem da fase aquática para terrestre pode durar uma hora, até que o novo mosquito possa voar. Após abandonar a exúvia pupal, o macho adulto permanece nas proximidades à espera da fêmea para a cópula (FORATTINI, 2002).

O adulto de *Aedes* representa a fase reprodutora do inseto. O macho distingue-se da fêmea pelo tamanho, sendo menor, e possui palpos mais longos e antenas plumosas. As fêmeas são hematófagas, realizando repasto sanguíneo durante o dia (ao amanhecer e ao anoitecer) e os machos alimentam-se de carboidratos extraídos de plantas. O *Aedes* pode ter várias fontes de sangue, como aves, mamíferos, inclusive o ser humano. Atacam os humanos principalmente nas pernas e pés (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; BRASIL, 2001).

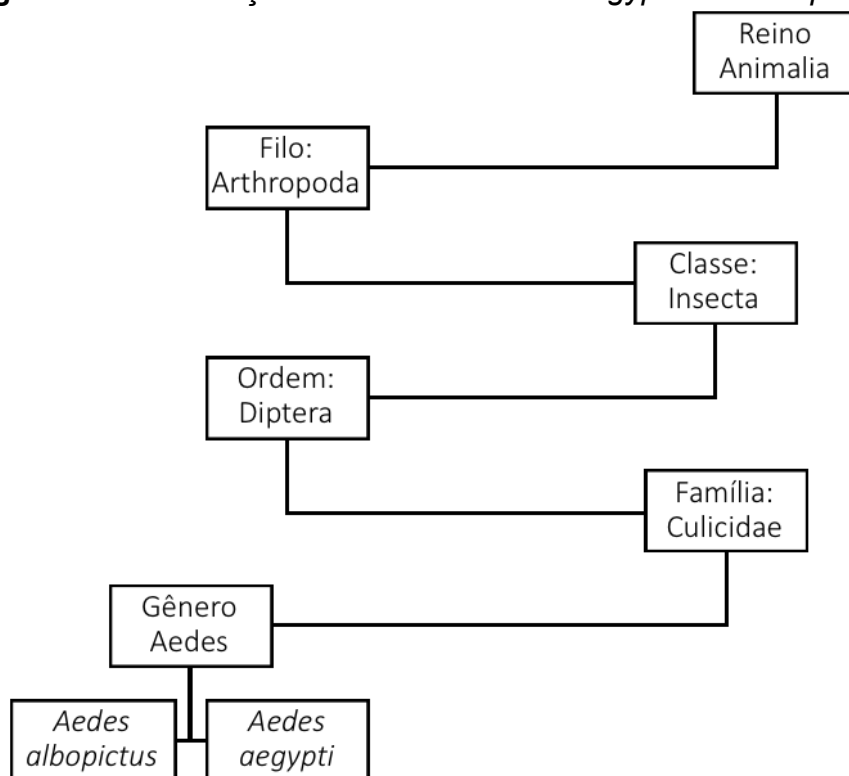
O sangue fornece as proteínas necessárias para a maturação dos ovos. As fêmeas realizam uma postura a cada repasto sanguíneo, geralmente com intervalo de três dias. A oviposição é salteada, em recipientes escuros e sombreados. O raio de dispersão das fêmeas pode ser aproximadamente de

100 metros, condicionado a presença de criadouros e fontes sanguíneas. Quando a fêmea está realizando repasto sanguíneo e é interrompida, ela procura outra fonte, comportamento que contribui na disseminação de doenças (BRASIL, 2001).

Os mosquitos do gênero *Aedes* se estabelecem com facilidade em regiões tropicais devido ao clima com temperaturas elevadas e altos índices de precipitação. A temperatura interfere nas taxas de reprodução dos mosquitos, o que pode contribuir com o aumento das densidades populacionais e consequentemente, com a ocorrência de doenças. No Brasil existem duas espécies de importância epidemiológica: *A. aegypti* e *A. albopictus* (FORATINNI, 2002; KRAEMER, et al, 2015).

O *A. aegypti* foi classificado por Linnaeus [*(Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762)] e o *A. albopictus* por Skuse [*Aedes (Stegomyia) albopictus* (SKUSE, 1895)]. A Figura 3 representa a classificação taxonômica dos dois insetos.

Figura 3: Classificação Taxonômica de *A. aegypti* e *A. albopictus*.



Fonte: O autor (2018) com dados de (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; OECD, 2018).

2.1.1 A espécie *A. aegypti*

O *A. aegypti* é antropofílico, de distribuição cosmopolita e sazonal, endofílicos, repousam em locais escuros, sombreados, possuem ciclo de desenvolvimento com duração de 7-10 dias, ovipõe em recipientes artificiais e geralmente a tarde (CDC, 1979; BRASIL, 2001; OECD, 2018).

O mosquito é originário da África, provavelmente da Etiópia, mas foi descrito no Egito, de onde vem seu nome. Ao longo do tempo, o mosquito foi se dispersando pelo mundo, conforme mostra a Figura 4.

Figura 4: Histórico do *Aedes aegypti* no Mundo e No Brasil

Antiguidade	• Descrição do <i>Aedes aegypti</i> no Egito
Século 16	• Propagação pelo Mundo através das Grandes Navegações
1818	• Mudança de nome: <i>Culex aegypti</i> para <i>Aedes aegypti</i>
Início do Século 19	• Surtos de febre amarela na América
Final do século 19	• Surtos de febre amarela no Brasil
1900-1901	• Descrição do <i>Aedes aegypti</i> como vetor da febre amarela em Cuba
1906	• Descrição do <i>Aedes aegypti</i> como vetor da dengue na Austrália
1903-1907	• Ações de Oswaldo Cruz no combate ao Aedes
1916	• Comprovação do <i>Aedes aegypti</i> como vetor de dengue durante epidemia
1950	• Erradicação do Aedes no Brasil
1986	• Reintrodução e manifestação da dengue de modo intermitente
Século XXI	• Brasil registra maior número de casos de dengue no Mundo
2013	• Maior surto de dengue no Brasil (2 milhões de casos relatados)
2016	• Trílice epidemia viral (dengue, zika e chikungunya)

Fonte: O autor (2018) com dados de BENCHIMOL, 2001; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994.

O *A. aegypti* apresenta distribuição geográfica descontínua, sendo determinada pela dispersão passiva causada pelo homem e a recepção de locais favoráveis a sua multiplicação, relacionados ao domicílio e peridomicílio

(NELSON, 1986; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). No Brasil, o *A. aegypti* está distribuído por 4.318 municípios (BRASIL, 2015).

O *A. aegypti* possui capacidade vetorial para os vírus dengue, zika e Chikungunya, podendo estar infectado com os três e transmitir os três vírus simultaneamente em uma única picada. Ainda, uma coinfecção no mosquito levaria a uma cooperação, pois se esses vírus têm mecanismos para suprimir a imunidade do mosquito, juntos desencadeiam uma ação sinérgica (RYCKERT, et al., 2017). O impacto da coinfecção deve ser melhor avaliado, mas ao menos um estudo mostra que é possível encontrar casos dos três vírus isolados em paciente (VILLAMIL-GÓMEZ, et al., 2016).

Adicionalmente, o mosquito *Aedes* spp. possui capacidade vetorial para os vírus da Febre Amarela, Chikugunya, Ross River, Oropoche, Encefalite do vírus Rocio, Encefalite equina, Dengue, Mayaro, Rift Valley, Zika, Wesselsbron, West Nile, Murray Valley, Encefalite japonesa, Encefalite de Saint Louis, bem como para o parasita *Dirofilaria immitis*, sendo um eixo comum para prevenção e combate de agravos de saúde humana e animal e importante problema na saúde pública (ROSEN, 1978; KAY; CARLEY, 1980; MITCHELL; FORATTINI; MILLER, 1986; RANDOLPH; HARDY, 1988; LIMA-CAMARA, 2016).

2.1.2 A espécie *A. albopictus*

O mosquito *A. albopictus* é um mosquito exótico no Brasil, assim como o *A. aegypti*, tendo origem asiática; foi descrito na Índia e foi registrado no Brasil pela primeira vez em maio de 1986 no Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986), dispersando-se pelo restante do país. Provavelmente o mosquito entrou no Brasil através dos portos e o seu processo de dispersão foi auxiliado pelo transporte de minério do ferro, que utilizava linhas ferroviárias. É um mosquito que se adapta facilmente em ambiente rural, semi-silvestre e silvestre, ao contrário do *A. aegypti*, que prefere acomodações humanas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; LIMA-CAMARA, HONÓRIO, LOURENÇO-OLIVEIRA, 2006).

É um importante vetor na Ásia e Europa e pode estar envolvido com a manutenção de doenças em locais que coexiste com *A. aegypti*. Está presente

em 2.126 municípios no Brasil, contudo, não é considerado o vetor principal de doenças no país (BRASIL, 2014a).

O comportamento de oviposição é similar ao de *A. aegypti*, depositando seus ovos em criadouros naturais e artificiais, estes por sua vez, geralmente abandonados pelo homem. O mosquito tem hábitos diurnos, sendo frequentemente encontrado no peridomicílio humano e com ciclo entre 10-15 dias (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Estudos demonstraram que em condições laboratoriais, a espécie é capaz de transmitir 22 tipos de doenças. Dentre as mais importantes estão a dengue (incluindo os quatro sorotipos), febre amarela, Chikungunya, o vírus da Febre do Nilo Ocidental e Ross River (GRATZ, 2004; GUEDES, 2006). Ele já foi causador de diversas epidemias de Chikungunya em outros países, o que ressalta a importância de sua vigilância (AKINER, 2016; BELLINI, 2016). Isso ressalta a necessidade de vigilância quanto a dispersão, seu papel na propagação de doenças no país, pois pode trazer graves danos à Saúde Pública.

2.2 CONTROLE DE *Aedes*

O controle de *Aedes* tem sido um desafio para os sistemas de saúde pública. Apesar dos esforços, investimentos e diferentes estratégias adotadas, o mosquito continua a causar epidemias, perdas econômicas e danos a população. As tecnologias utilizadas no controle de *Aedes* são empregadas de forma integradas, pois não há evidências que uma única tecnologia seja suficiente. A adoção da tecnologia está condicionada a eficácia, segurança, sustentabilidade e custos. As estratégias empregadas devem ser continuamente avaliadas quanto a sua efetividade e sustentabilidade (ZARA et al., 2016).

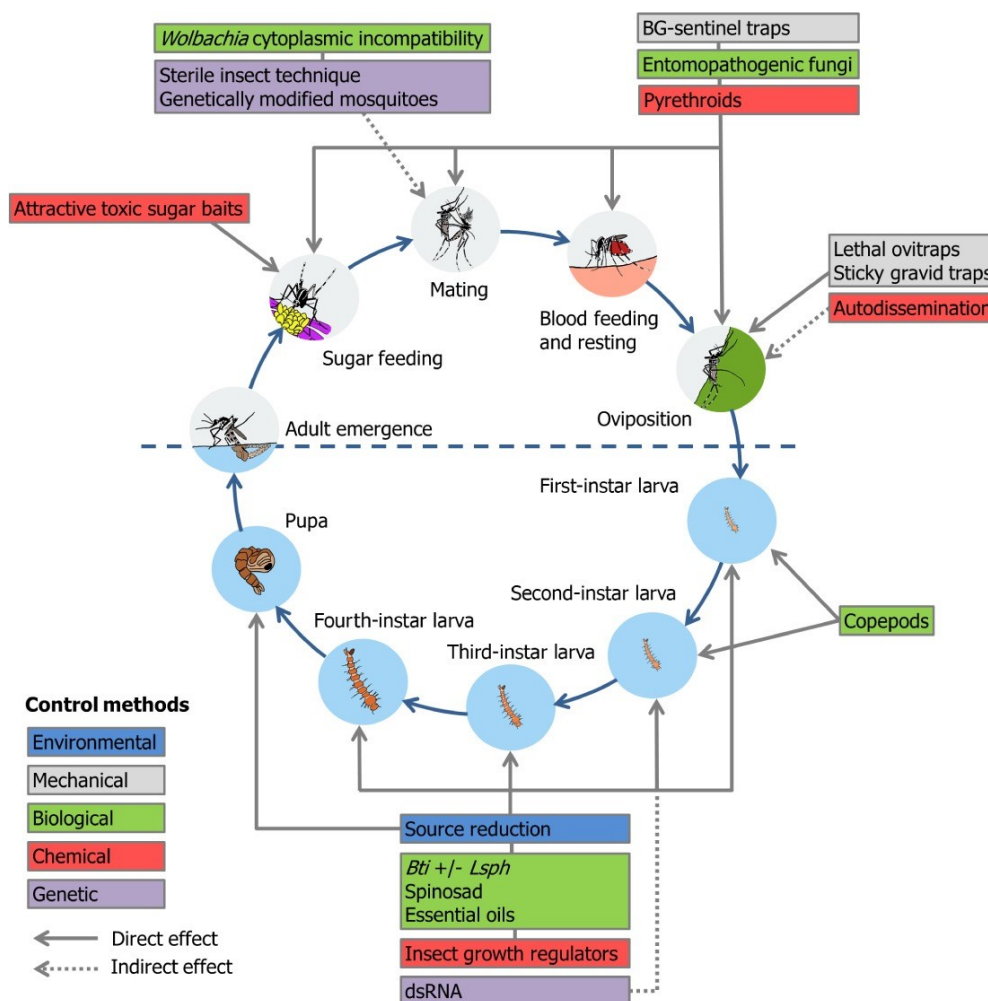
O controle é uma atividade complexa, sendo permeada por questões políticas, sociais e ambientais. Esse cenário influencia a manutenção e dispersão dos culicídeos vetores e das doenças transmitidas por eles. Os macrodeterminantes da manutenção do *Aedes* envolvem ausência de planejamento nos aglomerados urbanos, ausência de monitoramento da

resistência a inseticidas, melhoria e aumento no volume de transporte de pessoas e cargas, falta de gerenciamento de resíduos sólidos urbanos e racionamento de água (VALLE; BELLINATO; MARTINS, 2015).

A Organização Mundial de Saúde recomenda o Manejo Integrado de Vetores (MIV), que indica a combinação de métodos, envolvendo conhecimento sobre a biologia do mosquito e aspectos relacionados a transmissão da doença, investimentos em recursos humanos e infraestrutura, implementação de medidas efetivas, sustentáveis, colaboração entre saúde e organizações públicas e privadas, adequação as condições dos locais onde é implantado a fim de garantir a efetividade, eficácia e otimização (WHO, 2018a). Esse manejo contribui potencialmente na diminuição de transmissão de várias doenças, incluindo dengue, febre amarela, zika e chikungunya.

A necessidade de controlar o mosquito, evitar epidemias e reduzir ou eliminar as doenças transmitidas por esses mosquitos está refletida nas estratégias adotadas pelo sistema público de saúde. Entretanto, devido ao sucesso apenas parcial do controle do *Aedes* no Brasil e em muitos outros países, as ações e tecnologias em curso devem ser reavaliadas. Por outro lado, à luz da experiência obtida no controle desse vetor nas últimas décadas, as novas tecnologias, que despontam no cenário como promissoras, também precisam ser avaliadas (BALDACCHINO et al., 2015). Existem diversas técnicas de controle de *Aedes* relacionadas direta e indiretamente ao seu ciclo, como apresentadas na figura 5.

Figura 5: Métodos de controle de *Aedes* spp.



Fonte: BALDACCHINO et al. (2015)

Essas técnicas estão classificadas neste trabalho como métodos ambientais, químicos, mecânicos e biológicos.

2.2.1 Métodos ambientais

Os métodos ambientais são educação em saúde, mapeamento de riscos, cuidados ambientais e destruição dos criadouros de *Aedes*. Um exemplo de abordagem ambiental é a abordagem eco-bio-social, que explora a transdisciplinaridade entre ambiente e saúde, participação da comunidade e equidade na busca do equilíbrio no processo saúde-doença. Entre as atividades propostas estão a educação e participação consciente da população, cobertura de grandes tanques e parcerias entre as secretarias de

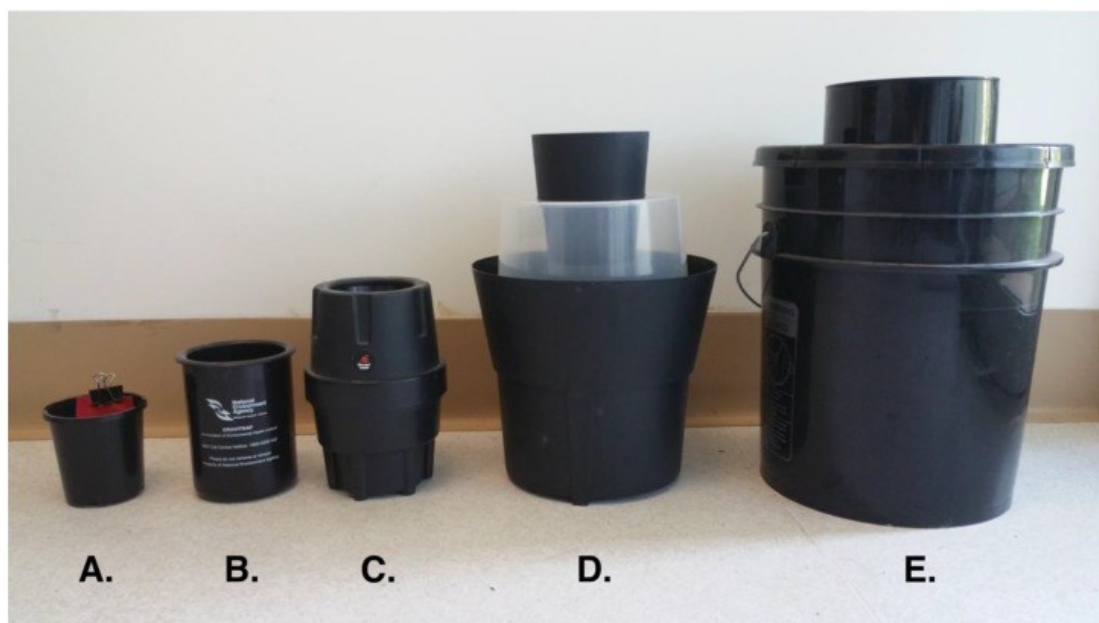
saúde e empresas que fazem coleta de lixo, como pneus (CAPRARA et al., 2009; CAPRARA et al., 2015).

O mapeamento de risco é uma ferramenta que integra noções de território e doença. Auxilia na compreensão da distribuição do vetor e da doença compilando dados de levantamento epidemiológico, entomológico, demográficos, climáticos, entre outros. A quantificação e distribuição espacial auxiliam na tomada de decisão e direcionamento de ações (LACON, 2014).

2.2.2 Métodos mecânicos

Os métodos mecânicos envolvem a utilização de armadilhas, que podem ser letais, pegajosas e atração por estímulos visuais e olfativos. Além de serem utilizadas como ferramentas de monitoramento, elas também são propostas para o controle do inseto, pela redução dos níveis de infestação. A captura de adultos e ovos é apontada como estratégia eficiente na redução ou prevenção de surtos (REGIS et al., 2008). Diversas armadilhas para capturar insetos têm sido desenvolvidas e propostas para o uso no controle de *Aedes* (Figura 6).

Figura 6: Armadilhas utilizadas para abordagens em massa para controle de *Aedes*.



(A) Ovitampa letal (armadilha com inseticida); (B) Ovitampa pegajosa (armadilha com substrato adesivo); (C) Mosquitrap® (armadilha com substrato adesivo e atrativo químico); (D) Biogents Gravid *Aedes* Trap (Armadilha para fêmeas de *Aedes*); (E) Autocidal Gravid Ovitrap (Armadilha para fêmeas de *Aedes*)

Fonte: Johnson, Ritchie e Fonseca (2017)

Algumas armadilhas propostas e utilizadas ao longo do mundo baseiam-se na oviposição realizada pelas fêmeas. A ovitampa foi desenvolvida com a finalidade de recolher ovos. A armadilha é constituída de um recipiente preto, um substrato de oviposição e água. O substrato de oviposição comumente é um pedaço de madeira, denominado palheta. A cor escura atrai as fêmeas para realizar suas posturas (FAY; PERRY, 1965). Ela é empregada para avaliar o impacto de medidas de controle, como aplicações de inseticidas (BRASIL, 2009), sendo útil para detectar pequenas variações na densidade populacional (ACIOLI, 2006).

Esta armadilha foi proposta como parte de um programa de redução sustentável de *Aedes* (REGIS et al., 2013). Entretanto, diante de terem utilizado diferentes medidas de controle durante o momento da avaliação da armadilha, não foi possível mensurar o real impacto da ovitampa.

Existem armadilhas que são voltadas para capturar formas adultas do inseto. A Adultrap é uma armadilha formada por dois compartimentos, um em que os mosquitos entram em busca de local para realizar posturas e outro que tem cones e uma parede de tela para ficarem presos (GOMES et al., 2008). Com a água servindo de isca atrativa para oviposição, a armadilha apresenta elevada sensibilidade para *A. aegypti* e *A. albopictus*. A armadilha imita um criadouro propício para o desenvolvimento larval e repouso de adultos (DONATTI; GOMES, 2007)

Armadilhas para fêmeas grávidas também tem sido desenvolvidas, testadas e utilizadas ao longo do mundo, como Biogents - Gravid *Aedes* Trap (BG-GAT) e CDC Autocidal Gravid Ovitrap (CDC-AGO) (MACKAY; AMADOR; BARRERA et al., 2014).

A BG-GAT é uma armadilha que atrai fêmeas de *Aedes*. Em busca de um local para oviposição, os mosquitos passam por um funil, ficam presos e são expostos a inseticida (EIRAS; BUHAGIAR; RITCHIE, 2014).

A armadilha CDC-AGO foi testada quanto ao seu potencial de uso em massa em Porto Rico. Foram instaladas 3 ou 4 armadilhas em 81 % das casas da área, capturando mosquitos e reduzindo em dez vezes o número de insetos se comparado com a área controle. Esta armadilha tem a capacidade de 19 litros, atrai as fêmeas para oviposição através de infusão fenada, que ficam presas em uma câmara de captura com adesivo. As fêmeas são obrigadas a repousar na área adesiva por não atingir a água, cujo acesso é impedido por uma tela (MACKAY; AMADOR; BARRERA, 2013).

Há armadilhas que exploram diversas formas de atração. Um dos princípios que têm sido explorados na concepção de armadilhas têm sido o emprego de substâncias adesivas. As armadilhas são construídas com uma superfície adesivo de modo que os insetos que tocarem no local, são aprisionados (SANTOS et al., 2012).

A Mosquitrap® foi testada com a finalidade de monitoramento. Algumas versões dessas armadilhas acrescentaram um composto químico, sintetizado a partir de infusões de gramíneas, para atrair os insetos, a exemplo da Mosquitrap® (GAMA et al., 2007; RESENDE; SILVA; EIRAS, 2010; RESENDE, 2013). A Mosquitrap® atrai as fêmeas através de um composto químico, que simula um atrativo de oviposição (AtrAedes™, Ecovec AS). As armadilhas pegajosas e a Mosquitrap® foram testadas no Brasil e não impactaram os níveis de infestação de *Aedes*, nas condições dos estudos (SANTOS et al., 2012; DEGENER et al., 2015).

Os mosquitos também são atraídos por fontes luminosas. Armadilhas que exploram o fototropismo dos insetos são, por exemplo, a CDC e a New Jersey. A New Jersey foi desenvolvida para ser utilizada como parte de programas de vigilância (MULHERN, 1985). A falta de seletividade da armadilha, necessidade de eletricidade e difícil transporte por causa do peso desestimularam seu uso. A armadilha CDC também utiliza luz incandescente ou ultravioleta. Recomendada para uso intradomiciliar, esta armadilha não é seletiva nas espécies que captura e requer ausência de fontes luminosas

competitivas (SUDIA-CHAMBERLAIN, 1988). Devido a difícil operacionalização e custos, estas armadilhas são empregadas essencialmente em pesquisa.

Armadilhas que utilizam o princípio de sucção também têm sido utilizadas ao longo do mundo, podendo ser associadas a outros estímulos ou não. As armadilhas Biogents-Sentinel® (BG-Sentinel, BGS) atraem os insetos através de pistas olfativas e visuais. Coletam fêmeas através de correntes de ar, que imitam o corpo humano, o BG-Lure como atrativo químico, cor escura, pode ser usada com CO₂ ou não. O CO₂ aumenta a capacidade de coletar insetos (KRÖCKEL et al, 2006). Além disso, a armadilha possui um ventilador, que produz uma sucção através do funil, suficiente para aspirar os mosquitos para o interior do coletor de insetos, onde morrem em 1 a 2 dias por desidratação. São utilizadas como ferramentas para vigilância (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2006; WILLIAMS et al., 2007). Essas armadilhas também são eficazes na captura de *A. albopictus* (OBENAUER et al., 2010).

Existem diversas formas de apresentação das armadilhas com inseticidas. Uma das mais promissoras é a armadilha com pyriproxifen (ABAD-FRANCH et al., 2015). O pyriproxifen é um análogo de crescimento juvenil, que impede que o *Aedes* complete seu ciclo. Ao visitar a ovitrampa e realizar oviposições, a fêmea tem as patas impregnadas pela substância. Devido ao seu comportamento de oviposição salteada, ela dissemina o larvicida por outros criadouros. Isso auxilia no combate aos criadouros crípticos, negligenciados em campanhas. Elas podem auxiliar na redução da densidade de mosquitos.

Outra apresentação de armadilhas com inseticidas foram as ovitrampas letais, que conduz a intoxicação da fêmea ao entrar em contato com o substrato de oviposição. Elas foram testadas no Brasil e no mundo (PERICH et al. 2003; SITHIPRASASNA et al., 2003; OCAMPO et al., 2009; RAPLEY et al., 2009) quanto a sua capacidade de coleta massal. No Brasil, as armadilhas conseguiram impactar os níveis de densidade mensurados por aspiração (PERICH et al., 2003), assim como na Tailândia (SITHIPRASASNA et al., 2003). A armadilha também foi testada na Colômbia, mas não apresentou diferenças significativas quando comparada a educação em saúde aplicada na área controle (OCAMPO et al., 2009).

Adicionalmente, existem diversas outras concepções de armadilhas sendo propostas na Internet. Um armadilha letal tem sido proposta na rede no Brasil, sendo divulgada em sites e redes sociais. A armadilha figura como uma ferramenta de controle e combate de *A. aegypti*.

A Mosquiteira foi idealizada e provavelmente patenteada por Antônio C. Gonçalves Pereira e o engenheiro Hermano César M. Jambo. A partir desse protótipo criou-se uma armadilha de eficiência equivalente, construída a partir de materiais recicláveis e de baixo custo. Um aprimoramento de armadilha letal para mosquitos *A. aegypti* veiculada na Internet (CABRAL, LIBERTO, 2015) foi proposta por Roque Morais Brito Filho, biólogo, com base no ciclo biológico do vetor, a qual elimina larvas e formas aladas do mosquito. A descrição detalhada da armadilha está disponível em artigo científico que segue essa revisão.

A armadilha deve ser posicionada em um local fresco e sombreado para funcionar como atrativo de oviposição de fêmeas de *A. aegypti*. Os ovos são depositados pelas fêmeas na face interna do cone de entrada da armadilha, pouco acima do nível da água; quando as larvas eclodem, nadam para o fundo da garrafa, em busca de alimento. Durante o estado larval, elas nadam livremente no interior da armadilha, alternando a alimentação e a respiração na superfície da água. As larvas evoluem para o estado de pupa e quando chegam à fase alada não têm por onde escapar da armadilha, morrendo no local. Essas características comportamentais do inseto, que garantem o funcionamento da armadilha, estão descritas em muitos estudos (REITER, 1996; BESERRA et al., 2010).

As fêmeas ovipõem em locais diversos, escuros e com água limpa. Assim, grupos de armadilhas devem ser estrategicamente depositados no intradomicílio, para maximizar as chances de que as fêmeas venham a fazer oviposições nos funis das armadilhas. Existe ampla capacidade de utilização da armadilha para diversos fins, como parte de um sistema de geolocalização (MORAES et al., 2015) e educação (WALDEZ et al., 2014), mas há lacunas quanto a estudos em campo, sendo necessárias pesquisas para validação dessas informações e uso assegurado por experimentos pela população. Esse tipo de armadilhas foi avaliado em ensaio, no presente trabalho.

2.2.2 Métodos biológicos

Os métodos biológicos abrangem a utilização de copépodes, larvófagos, utilização de *Bti*, óleos essenciais, insetos estéreis irradiados ou geneticamente modificados, insetos infectados com *Wolbachia* e insetos transgênicos contendo um gene drive para supressão ou substituição de populações.

Os copépodes alimentam-se de larvas de *Aedes* e são utilizados para auxiliar na redução de populações (MARTI et al., 2004; NAM et al., 2005). Outros larvófagos também são apontados com potencial de controle de *Aedes*, como peixes (PAMPLONA, 2004; CAVALCANTI et al., 2007).

O *Bacillus thuringiensis* (*Bti*) é uma bactéria entomopatogênica apontada como promissora no combate ao *Aedes*, sem prejudicar o meio ambiente. A utilização da bactéria pode ser uma alternativa a resistência de produtos químicos. A bactéria produz endotoxinas e apresenta potencial em ensaios de curto prazo mas carece de avaliação a longo prazo (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003; SETHA et al., 2016).

Insetos com *Wolbachia* têm sido testados para o controle de *Aedes*. A bactéria contamina aproximadamente 60% dos insetos, levando a menor longevidade e menores índices de transmissão viral de dengue e chikungunya, o que reduz a pressão de transmissão das arboviroses (WALKER et al., 2011; O'NEILL, 2018). A sustentabilidade é garantida pela transmissão venérea da bactéria. Adicionalmente, algumas cepas específicas causam esterilidade, levando a oviposições de ovos inférteis. Estudos de campo estão sendo desenvolvidos no Brasil, que fazem parte do programa mundial *Eliminate Dengue*. Estudos com a infecção de *A. aegypti* por *Wolbachia* também indicam que a bactéria também interfere na transmissão do vírus zika (DUTRA et al., 2016; CARAGATA; DUTRA; MOREIRA, 2016).

A técnica de insetos estéreis se baseia na produção e liberação de machos irradiados que, ao cruzarem com fêmeas, induzem mortalidade da prole (LESS et al., 2015). A abordagem não tem exigências regulatórias. Essa abordagem tem sido muito bem-sucedida no controle de pragas agrícolas, mas ainda não ganhou uso em mosquitos, em parte pela fragilidade dos insetos irradiados e redução da competitividade em campo (ANDRADE et al., 2016).

Abordagem similar pode ser alcançada pelo uso de insetos geneticamente modificados, como é o caso do mosquito OX513A. Entretanto, esses insetos passam por um custoso processo regulatório, tanto no Brasil como na maior parte dos demais países. Em 2014, o mosquito OX513A, chamado comercialmente de *Aedes do bem*, foi aprovado pela CTNBIO (ANDRADE et al., 2016). O mosquito tem dois genes adicionais no genoma, que conferem mortalidade condicional (na ausência de tetraciclina) e fluorescência vermelha quando as larvas são iluminadas com luz UV. Os machos são liberados no ambiente para encontrar fêmeas e cruzar, o que garante em princípio acesso a criadouros crípticos. Essa tecnologia é proposta como alternativa aos inseticidas complementar às demais ações de controle, tendo sido apresentada como promissora nos testes de campo (CARVALHO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; ANDRADE et al., 2016).

Uma técnica genética que tem sido proposta para utilização no combate de vetores é o gene drive, para supressão ou substituição de populações. A abordagem mais simples seria soltar machos que só geram machos, o que fatalmente levaria a uma rápida redução da população e, eventualmente, à erradicação. O produto não existe, ainda, mas com as novas técnicas de edição de genoma torna-se relativamente simples produzir uma variedade de *A. aegypti* com essas características. As discussões sobre a segurança ambiental deste tipo de abordagem são enormes e não se espera a adoção comercial ou liberação em campo de qualquer organismo expressando um caráter transmitido por um gene drive (herança supra-Mendeliana) nos próximos 15 anos (HAMOND et al., 2016; ROBERTS, et al., 2017; LI et al., 2017).

2.2.3 Métodos químicos

Os métodos químicos incluem larvicidas e inseticidas. A OMS propõe o uso de produtos químicos como método complementar aos métodos ambientais e em casos de emergências. Recomenda-se que sejam de baixa toxicidade para outras espécies e não causem alterações nas características da água. A pulverização de inseticidas residuais é recomendada no Brasil

apenas em situações de emergência, para conter epidemias ou prevenir a instalação de uma, auxiliada pelo sistema de notificação. O cronograma de aplicação do inseticida pode variar de acordo com a necessidade, mas sempre amparado pela vigilância epidemiológica e entomológica. Inseticidas para mosquitos adultos visam diminuir a densidade populacional, podendo ser espacial ou residual (WHO, 2018b). A aplicação de inseticida intradomiciliar visa matar os insetos por contato. Os mosquitos costumam se abrigar em locais escuros e sombreados, como tanques, pias e parte traseira de móveis (PAREDES-ESQUIVEL, 2016). Entretanto, Donalísio e Glasser (2002) alertam sobre a supervalorização do controle químico no Brasil, esclarecendo suas restrições e a necessidade de monitoramento dos tratamentos nas ações de campo.

O RNA de fita dupla pode ser empregado no controle de *A. aegypti*, explorando o mecanismo de inativação da expressão gênica conhecido como interferência de RNA. A distribuição desse RNA no ambiente contamina as larvas, que o absorvem por ingestão. O RNA de interferência distribui-se por todas as células do inseto, levando a silenciamento de genes alvo. A inativação da beta-tubulina e da quitina sintetase-1, por exemplo, resulta em mortalidade ou desenvolvimento incompleto. O seu potencial larvicida concorre vantajosamente com inseticidas químicos, devido à alta especificidade e menor potencial de resistência (SINGH et al., 2013). Também foi testado quanto ao seu potencial uso em adultos, sendo aplicado topicamente, por pulverização, com foco no gene de inibição da apoptose (PRIDGEON et al., 2008).

2.3 AÇÕES INTEGRADAS DE CONTROLE DO *A. aegypti*

A sustentabilidade das ações de controle depende da incorporação das estratégias adotadas à rotina da Vigilância em Saúde. As ações dependem de planejamento para que sejam executadas, além de avaliações periódicas de seus frutos. Atualmente, o serviço de controle no Brasil une diversas estratégias, entre elas, controle químico, controle mecânico através da remoção de criadouros e educação em saúde repassada por agentes de endemias (ACE) e agentes comunitários de saúde (ACS). Entre suas

competências, os agentes devem estar atentos a criadouros e novos casos de doenças transmitidas pelo *Aedes*. A vigilância entomológica e vigilância epidemiológica unem-se nessas ações com o propósito de prevenir, controlar e detectar surtos (BRASIL, 2009; SOUZA, et al., 2016). Os esforços se concentram para que as ações de controle sejam implementadas em momento oportuno. A vigilância epidemiológica divide-se em quatro subcomponentes: vigilância de casos; vigilância laboratorial; vigilância em áreas de fronteira; vigilância entomológica.

2.4 VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA

A vigilância entomológica no Brasil baseia-se atualmente na pesquisa larvária (BRASIL, 2013), uma técnica focada na vistoria das casas em busca de criadouros e coletas das larvas do mosquito nesses locais. A pesquisa larvária, também denominada de LIRAA, tem como objetivo principal fornecer dados para fundamentar medidas oportunas. O acompanhamento dos níveis de infestação é em teoria possível com a consolidação dos índices calculados a partir de visitas e coletas de larvas realizadas pelos ACEs em residências e outros imóveis. A introdução da chikungunya, doença que também pode ser transmitida pelo *A. albopictus*, requer que a distribuição desse novo vetor no país seja monitorada (BRASIL, 2013; PANCETTI, et al, 2015). O *A. albopictus* transita entre os ambientes rurais e urbanos, o que implica na necessidade de cobertura da vigilância entomológica além dos limites urbanos, para o conhecimento de sua real dispersão (PANCETTI, et al, 2015).

Em que pese a adoção do LIRAA em todos os municípios do país, estudos apontam que essa metodologia é cara e ineficiente quando comparada com outras ferramentas, a exemplo das armadilhas. Na Figura 7, onde se comparam os desempenhos de vários sistemas de alerta para índices entomológicos, está claro que o LIRAA não deveria ser uma opção de país, sobretudo nas condições ambientais urbanas brasileiras e na distribuição geral do mosquito pelos municípios de todas as 5 regiões (BRAGA et al., 2000, GOMES, 2002; BRASIL, 2014b).

Figura 7: Quadro com comparação de métodos de levantamento de índices entomológicos.

	Adultrap	BG-Sentinel	MosquiTrap	ovitampa	Índice larvário
especificidade					
sensibilidade					
consistência					
concordância					
custo					
opinião					

Fonte: BRASIL (2014b)

A vigilância entomológica é indispensável, mas precisa ser efetiva para que respalde as ações de controle. Existem diversas dificuldades que precisam ser solucionadas para que isso aconteça, entre elas:

- a. Necessidade de aprimoramento nas técnicas de monitoramento da densidade do vetor em área que coexista duas ou mais espécies vetoras e em áreas de crescimento urbano vertical;
- b. Necessidade de ampliação da capacitação de recursos humanos e de núcleos de entomologia na maioria dos estados (GOMES, 2002);

A análise morfológica é o padrão-ouro para identificar mosquitos e larvas de acordo com seus caracteres externos, utilizando chaves taxonômicas; requer, porém, muito tempo e é dificultada quando as características morfológicas como cerdas são manipuladas impropriamente. Técnicas moleculares podem acelerar o processo de identificação destes culicídeos (CHAN, et al., 2014). No cotidiano da rotina do serviço público, os técnicos laboratoriais fazem a identificação das espécies por observação direta em microscópio, utilizando larvas conservadas em álcool 70° GL e uso da chave taxonômica proposta por CONSOLI e OLIVEIRA (1994).

2.5 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

A vigilância epidemiológica foi definida pela Lei n ° 8080/90, com o objetivo de fornecer orientações técnicas, executar ações de controle e

prevenção de doenças e agravos (BRASIL, 1990). É essencial para o processo de tomada de decisão em ações de planejamento, organização e execução em Saúde Pública (MANDYATA et al., 2017).

As doenças e agravos são acompanhados temporalmente e espacialmente através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, 2007). O sistema é alimentado pelos profissionais de saúde, através de notificação e investigação de casos que estão elencados na Lista nacional de doenças de notificação compulsória. Podem ser notificados surtos e agravos de interesse estadual e nacional.

O sistema funciona de forma descentralizada, em que os profissionais informam em seus locais de trabalho e as informações são repassadas aos níveis municipal, estadual e federal. A notificação é obrigatória para médicos, outros profissionais de saúde e responsáveis por estabelecimentos de saúde públicos ou privados que prestam assistência ao paciente, em conformidade com o artigo 8º da Lei n. 6.259, de 30 de outubro de 1975. A notificação compulsória deve ser realizada imediatamente, diante da suspeita, pelo profissional que realizar o primeiro atendimento em até 24 horas. Pode ser realizada ainda por qualquer cidadão (BRASIL, 1975; BRASIL, 1990).

A Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública que está sendo utilizada nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional é regida pela Portaria nº 204 GM/MS, de 17 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016a) e consolidada pela Portaria de Consolidação Nº 4, de 28 de setembro de 2017 (BRASIL, 2017). Entre 48 doenças e agravos da lista, constam dengue, zika e chikungunya, arboviroses transmitidas pelo *Aedes*.

2.5.1 Arboviroses transmitidas pelo *Aedes*

Os arbovírus (“arthropod borne viruses”) são vírus transmitidos por artrópodes. Há 545 espécies desse grupo de vírus registradas, sendo 150 causadoras de doenças em seres humanos. As doenças transmitidas pelo *Aedes*, como zika, febre Chikungunya, dengue e febre amarela, são, naturalmente, arboviroses (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Durante a

tríplice epidemia viral em 2016, dengue, zika e chikungunya estiveram presentes em diversas cidades do país.

A vigilância epidemiológica de arboviroses depende de colaboração, trabalho interprofissional, funcionamento de laboratórios de diagnóstico e rapidez no processo de tomada de decisão no controle do vetor. Ainda que a vigilância seja considerada por muitos como uma atividade apenas burocrática, não despertando o interesse, principalmente pelos médicos dos serviços de saúde, a qualidade da informação vai influenciar nas ações de controle, podendo conduzir a prevenção de surtos ou a instauração de grandes epidemias (TAUIL, 2002).

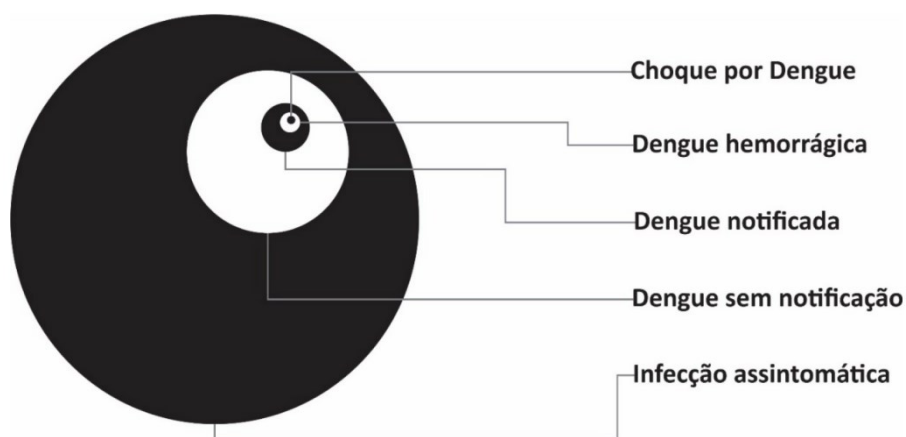
2.5.1.1 Dengue

A dengue é uma doença causada por um vírus, de genoma de RNA, da família Flaviviridae. A doença se apresenta com quatro sorotipos virais circulantes no Brasil, caráter endêmico, alterando períodos epidêmicos e interepidêmicos. É uma enfermidade que é frequente nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. A vigilância é baseada nos indicadores entomológicos e epidemiológicos, amparados pelo diagnóstico da doença. A alta densidade populacional e o baixo status econômico facilitam a transmissão de dengue. A presença intermitente e surtos recorrentes refletem a deficiência no controle de seu vetor (GUO et al., 2017).

Os sintomas da doença mais frequentes são mialgia, artralgia, febre, petéquias, dor de cabeça e dor retro-orbital. A doença pode se apresentar de forma assintomática, como febre clássica, febre hemorrágica e síndrome do choque da dengue (HASAN et al., 2016).

Apesar dos avanços científicos, ainda não há vacinas ou remédios eficazes contra a doença. Embora seja uma doença muito conhecida dos brasileiros e tenha uma morbidade considerável, a subnotificação persiste. Essa dimensão pode ser vista na Figura 8:

Figura 8: Representação do nível de subnotificação de Dengue



Fonte: Góis (2017)

2.5.1.2 Febre chikungunya

A febre chikungunya recebeu esse nome em um surto da doença na Tanzânia. A palavra significa “aquele que se dobra”, originada no idioma africano makonde. O vírus causador da doença é da família *Togaviridae* e produz sintomas como febre, mialgia, artralgia, dor de cabeça, diminuição do volume celular de linfócitos, neutrófilos e leucócitos, e petéquias. A artralgia permanece na fase crônica por meses ou anos, sendo muito importante para o diagnóstico diferencial (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; KUCHARZ, CEBULA-BYRSKA, 2012). O vírus provavelmente se manteve durante anos na África em ciclo silvestre e depois espalhou-se pelo mundo (PRESTI et al., 2014). O histórico da doença está apresentado na figura 9.

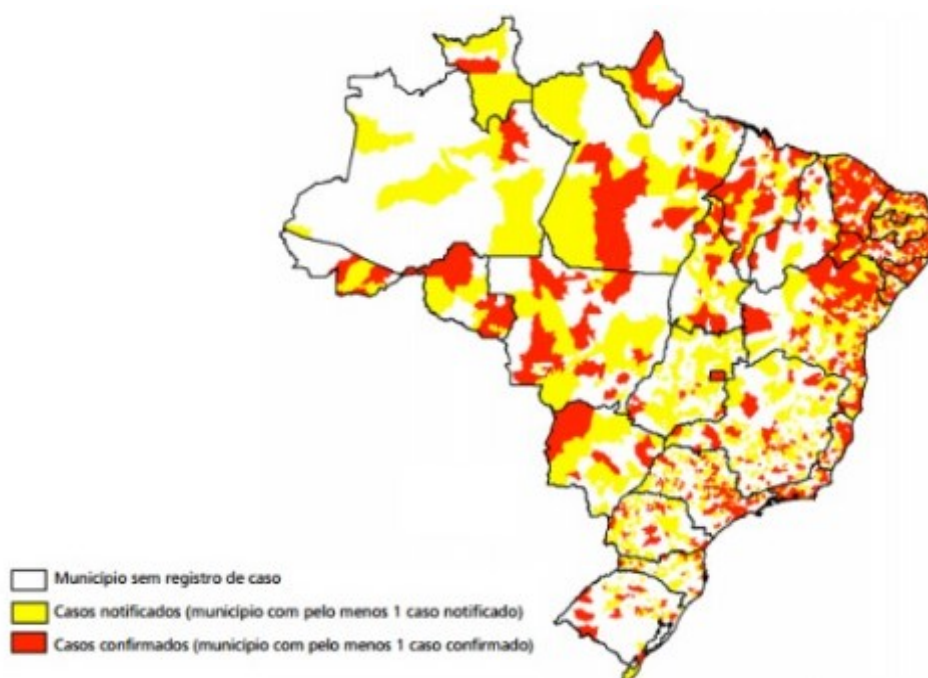
Figura 9: Histórico da doença no Mundo e Brasil



Fonte: Autor (2018) baseado em BRASIL (2014b).

A doença chegou ao país e alastrou-se rapidamente, como mostra a figura 10.

Figura 10: Distribuição espacial dos casos notificados e confirmados de chikungunya no Brasil até agosto de 2016.



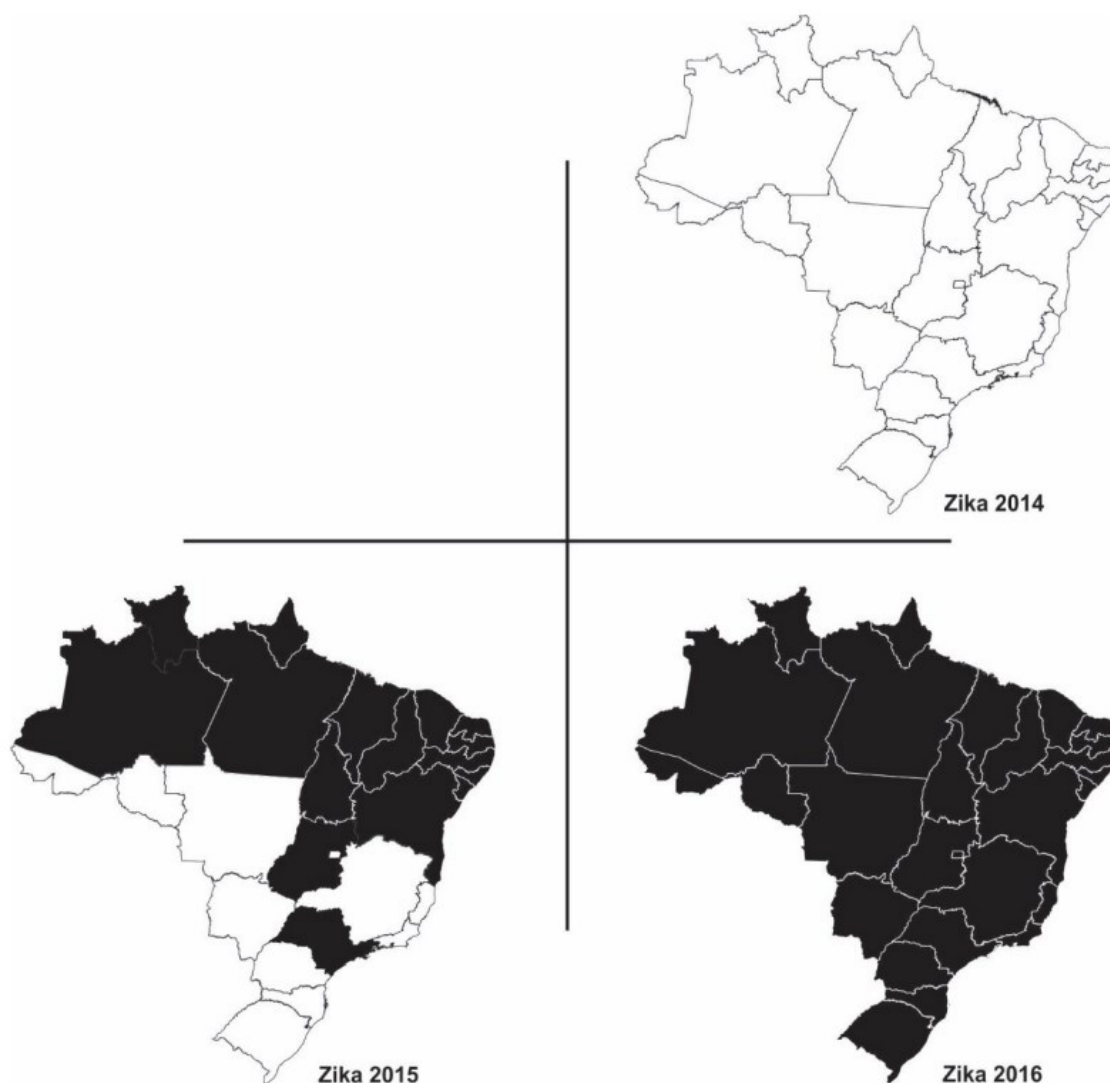
Fonte: BRASIL (2016b)

2.5.1.3 Zika

O vírus zika foi isolado de um macaco rhesus com febre em 1947, na floresta de Zika, perto de Entebbe, na Uganda. Os sintomas mais frequentes são artralgia, febre, mialgia, dor de cabeça, conjuntivite, dor retro-orbital, edema e prurido. Análises filogenéticas mostram que o vírus pode ser classificado em linhagens asiática e africana. Ao longo do tempo (1947-2007), o vírus sofreu pressão seletiva negativa, sofrendo deleções e recombinações, alertando a necessidade de compreensão de aspectos epidemiológicos e zoonóticos (PLOURDE, BLOCH, et al., 2016).

Até o momento não existem vacina ou remédios para a doença. No Brasil, no começo de 2015, pessoas apresentando febre, artralgia, conjuntivite e erupções na pele, procuraram os serviços de saúde em Natal, Rio Grande do Norte. Fizeram testes para dengue e chikungunya, mas os resultados foram negativos. O vírus zika foi detectado através de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa e os resultados confirmados por sequenciamento de DNA (ZANLUCA, et al., 2015). A doença alastrou-se pelo país rapidamente como mostrado na figura 11.

Figura 11: Distribuição temporal das notificações de zika no Brasil.



Fonte: GÓIS, 2017

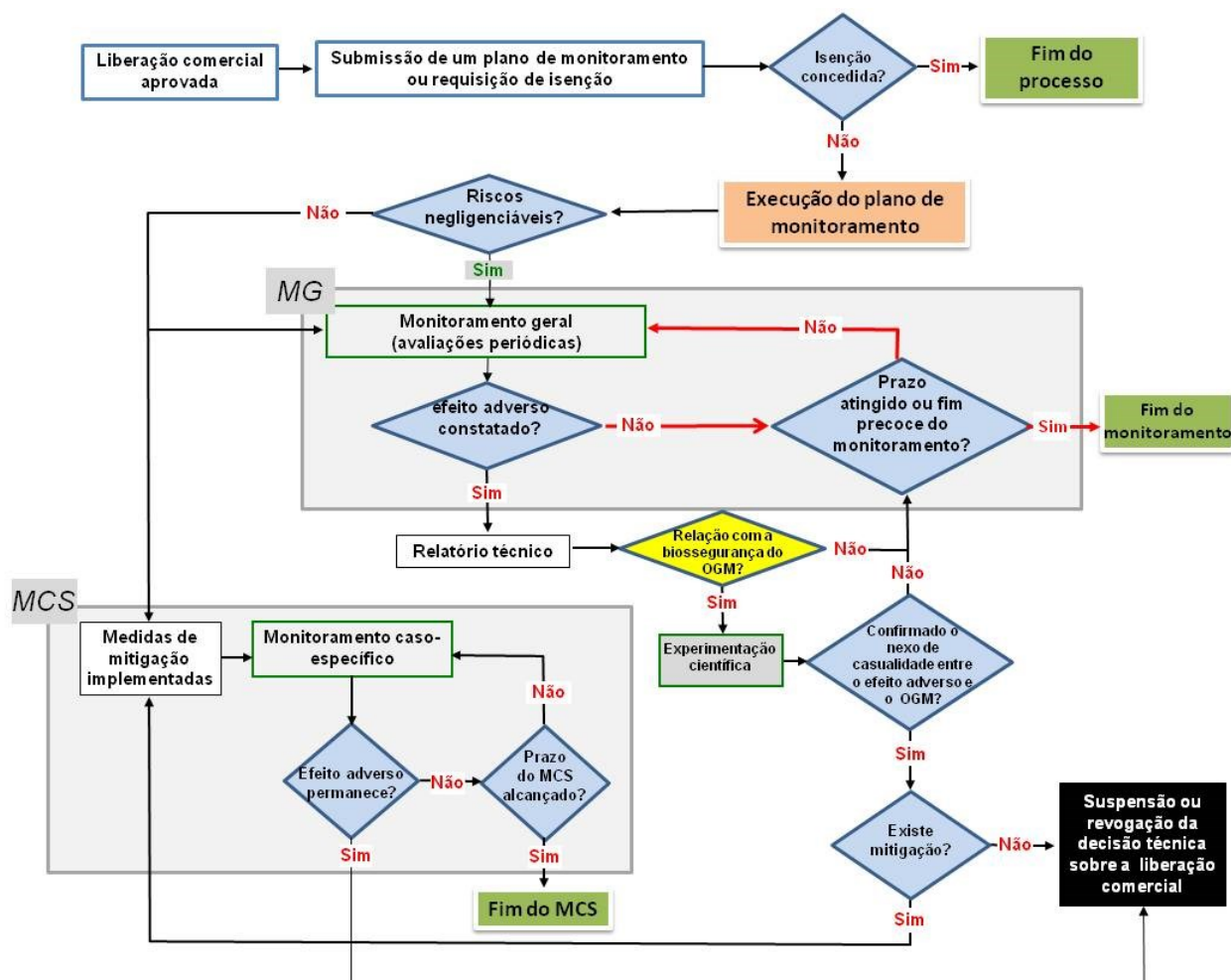
Durante sua evolução no país, a zika foi associada ao crescente número de crianças nascendo com microcefalia. O vírus zika foi encontrado no líquido amniótico de grávidas (CALVET et al., 2016) e estudos foram conduzidos para comprovar a relação, como um que induziu a infecção por zika em modelos experimentais, causando mal-formação (CUGOLA et al., 2016).

2.6 AVALIAÇÃO DE RISCO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMS)

A legislação brasileira sobre biossegurança data de 1995. A lei estabeleceu normas para a manipulação e uso de OGMs em território nacional e foi revista em 2005 (lei nº 11.105, de 24 de março de 2005), quando deu maiores poderes à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), órgão vinculado ao Ministério da Ciência e Tecnologia, e eliminou os conflitos de autoridade presentes na versão inicial da lei. No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança assessora o governo em questões relativas a segurança de OGM e analisa tecnicamente todas as atividades relacionadas a engenharia genética no Brasil, desde os estudos em laboratório até o adequado descarte (BRASIL, 2018a).

A legislação garante que os OGMs sejam submetidos a um processo rigoroso de avaliação, que termina como parecer técnico da CTNBio. Quando um processo de liberação comercial de um OGM é submetido para avaliação da CTNBIO, ele percorre o caminho ilustrado na figura 12.

Figura 12: Submissão de um projeto de OGMs para avaliação de risco pela CTNBIO.



Fonte: BRASIL (2018b)

Durante a avaliação da CTNBio, o que importa é a segurança do evento transgênico para a alimentação humana e animal e para o ambiente. O estudo dos prováveis impactos de um OGM nos alvos de proteção garantidos pela legislação do país é chamado avaliação de risco e leva em conta essencialmente os aspectos biológicos da questão. As implicações sociais, políticas ou econômicas derivadas da adoção comercial de um produto transgênico não são da alçada da CTNBio, mas do Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS. O CNBS reúne-se quando o Presidente da Casa Civil o convoca e é composto por 11 ministros de Estado. Cabe ao CNBS a análise de risco do OGM proposto para liberação comercial, que inclui, como

comentado, os aspectos socioeconômicos, mas também o manejo e a comunicação de risco (BRASIL, 2008).

A avaliação de risco é feita a partir do estudo da probabilidade de exposição a um perigo e da magnitude do dano que pode ser derivado dessa exposição. Assim, o risco é, para fins da avaliação de risco em biotecnologia, a composição de exposição e dano, como mostrado na figura 13 abaixo. Entretanto, nem a probabilidade de exposição nem a magnitude do dano são expressas em números, mas em quatro categorias, ou classes. A classificação, embora parece pouco rigorosa como tratamento numérico, permite contornar as dificuldades inerentes às quantificações, sem reduzir a validade das conclusões e confiança nos resultados da avaliação de riscos (ANDRADE; PARROTT; ROCA, 2012).

Figura 13: Matriz de cálculo do risco representado por um OGM

		ESTIMAÇÃO DO RISCO			
PROBABILIDADE	MUITO ALTA	BAIXO	MODERADO	ALTO	ALTO
	ALTA	BAIXO	BAIXO	MODERADO	ALTO
	BAIXA	INSIGNIFICANTE	BAIXO	MODERADO	MODERADO
	MUITO BAIXA	INSIGNIFICANTE	INSIGNIFICANTE	BAIXO	MODERADO
		MARGINAL	MENOR	INTERMEDIÁRIA	GRANDE
CONSEQUÊNCIAS					

Fonte: Andrade, Parrott, Roca, (2012)

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

Apresentados sob a forma de artigos:

ARTIGO 1 – Mass trapping with a plastic lethal trap does not reduce intradomiciliary *Aedes aegypti* abundance (título sugerido para a versão em inglês)

Submetido a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

ARTIGO 2 - Underreporting in known and new epidemics: lessons derived from the analysis of an outbreak of dengue, zika and chikungunya in a community in Brazil

Submetido a revista Bulletin of the World Health Organization.

ARTIGO 3 – Otimização da detecção molecular de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em pool de larvas

A ser submetido a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

ARTIGO 1 – Mass trapping with PET lethal traps does not reduce intra-domiciliary *Aedes aegypti* abundance

MARÍLIA ANDREZA DA SILVA FERREIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, RECIFE, PERNAMBUCO, BRAZIL

SÉRGIO SANTOS DE AZEVEDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, CAMPINA GRANDE, PARAÍBA, BRAZIL

MIRELE ADRIANA DA SILVA FERREIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, CAMPINA GRANDE, PARAÍBA, BRAZIL

MARIA EMILIA FERREIRA DE AZEVEDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, CAMPINA GRANDE, PARAÍBA, BRAZIL

GUILHERME DE MEDEIROS LINS DE ARAÚJO

FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS, PATOS, PARAÍBA, BRAZIL

IDERALDO DA SILVA MEDEIROS

FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS, PATOS, PARAÍBA, BRAZIL

EDERSON AKIO KIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, RECIFE, PERNAMBUCO, BRAZIL

PAULO PAES DE ANDRADE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, RECIFE, PERNAMBUCO, BRAZIL

Corresponding author's e-mail: marilia.andreza.masf@gmail.com

Abstract:

BACKGROUND: *Aedes aegypti* is a vector for several important diseases in Public Health, including Dengue, Zika and Chikungunya and yellow fever. National guidelines for controlling diseases transmitted by *Aedes* include vector control measures. At the same time, the population seeks alternatives for protection when official strategies do not seem to reduce the risk of contracting disease. Among these alternatives, traps that promise to control vectors and

reduce the risk of arbovirus-based illnesses are commercially available or advertised through social media.

Objectives: to evaluate the efficacy of a PET bottle-based trap for intra-domiciliary reduction of *A. aegypti* population density.

Methods: the trap consisted of a 2L PET disposable bottle, with the upper (cone-shaped) part inverted into the container, painted with black synthetic enamel and sand, with a piece of nylon organza fabric attached to the bottle thread. The traps contained water and had a rough, dark surface to make them more attractive for oviposition. During 13 weeks, ovitraps and PET traps (in groups of 4 and 8) were installed in sample houses in an area of high *A. aegypti* density. The control group consisted of houses without PET traps. Ovitrap were used as sentinels.

Findings: this study is the first to evaluate the field efficacy of PET traps. Egg indexes from ovitraps did not display statistical difference between groups, indicating that PET traps are not effective for intra-domiciliary vector control within the prevailing environmental conditions in the country.

Conclusion: it is essential to evaluate the traps available in the market or – as the ones here evaluated – those that are easily homemade, to avoid adoption of devices that may lead to a false impression of safety, if they are not effective.

Introduction

Aedes aegypti mosquitoes are vectors capable of transmitting several diseases, including Dengue, Zika and Chikungunya fevers, which combined into the triple viral epidemic in Brazil ⁽¹⁾ in 2016. They are also potential vectors for yellow fever, a disease in risk of reemerging in the country ⁽²⁾. The household-based reduction of mosquitoes has been one of the pillars of *Aedes aegypti*

vector control in Brazil and there are several approaches advocated by the Ministry of Health or suggested by specialists for this purpose: house-to-house work carried out by Community Health Agents, use of insecticides against larvae and adults (e.g., growth regulator analogues in use within the country), vaccines, biological control, health education, biocontrol via transgenic or *Wolbachia*-infected mosquitoes, among others⁽³⁾.

Traps for *Aedes* have been proposed as control alternatives, including ovitraps for egg capture and subsequent destruction⁽⁴⁾, lethal ovitraps^(5,6) and traps for pregnant *Aedes* females⁽⁷⁾. However, none of them have so far been recommended for indoors vector reduction by public health programs in Brazil in accordance with the National Guidelines for the Prevention and Control of Dengue Epidemics.

Solutions that promise short-term and low-cost results are very attractive. Consequently, in periods of epidemics, the population tends to use alternatives to the methods recommended by the government for vector control, such as larvae-eating fish predators⁽⁸⁾, window screens⁽⁹⁾, commercial and homemade, insect repellents, candles and other smokers, as well as adult traps and ovitraps.

In Brazil, there are over twenty different traps readily available on the market, advertised by suppliers as effective against mosquitoes, based on different principles, such as suction⁽¹⁰⁾, light attraction⁽¹¹⁾, light attraction associated with suction⁽¹²⁾, attraction by light and CO₂ associated with suction⁽¹³⁾, etc. There is no record that these traps have been evaluated for indoor vector density reduction by the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO) or by independent researchers, nor that any

evaluations by foreign official registration authorities have been accepted and homologated in Brazil.

Among the homemade traps is the oviposition trap manufactured with PET (polyethylene terephthalate) bottles ⁽¹⁴⁾, also known as “Mosquitoeira” or “Mosquitérica”, which aims to retain the larval forms and emerging adults of *Aedes* spp. through oviposition. Instructions for its assembly and use can be found in dozens of Brazilian websites, contributing to its potential public use ⁽¹⁵⁾. It was not originally developed to combat the vector, but only as a sentinel trap and for health education. Nevertheless, it is essential to verify its effectiveness in reducing vector density within households. There are no reports that PET traps have been evaluated by government agencies and there is no scientific position on its utility as an *Aedes* sp. vector control tool, which increases the risk of its use in times of epidemic, especially by the low-income portion of the population.

In this study, a field trial was carried out to evaluate the efficiency of lethal traps produced with PET bottles for reducing intra-domiciliary vector density, which is expected as a result of egg retention and population decrease through oviposition of mosquitoes in the trap.

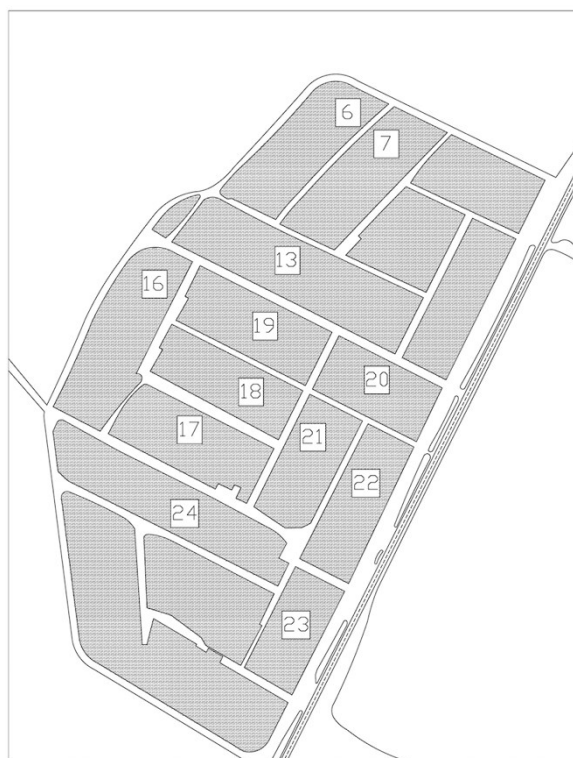
Methodology

Study area:

The study was carried out in the neighborhood of Nova Conquista (2,459 inhabitants according to the 2010 Census), in the city of Patos (07 ° 01 '28 "S 37 ° 16' 48" W, Figure 1), Paraíba state, around 316km distant from the state capital João Pessoa. For the entomological survey, we selected 100 residences

separated by a minimum gap of 30m. Most of them had plumbing systems with periods of 2 to 5 days of water shortage, and most of the streets were paved. Historically, the site has been heavily infested by *A. aegypti*, according the Rapid Index Survey (LIRAA) provided by the local Environmental Surveillance Agency. The masonry houses were similar in structure, usually with a kitchen, living room, bathroom and one or two bedrooms. In most of them, there is a yard or a wall in the back of the residence, often harboring a second household. There was a common presence of materials capable of accumulating water, even after the cleaning work provided in partnership with the Environmental Surveillance agency, prior to the beginning of this study. The area (Figure 1) involved 12 blocks; PET traps and ovitraps were installed in 22 residences; only ovitraps were installed in 27 other residences that served as controls.

Figure 1. Representation of the area with high *Aedes aegypti* density in the Nova Conquista neighborhood, Patos city, Paraíba state, Brazil. The numbers indicate the blocks included in this study. Houses in blocks 18, 21, 22, 23 and 24 had both PET traps and ovitraps installed, houses in blocks 6, 7, 13, 16 17 19 and 20 only ovitraps and block 21 had both control and sample houses.

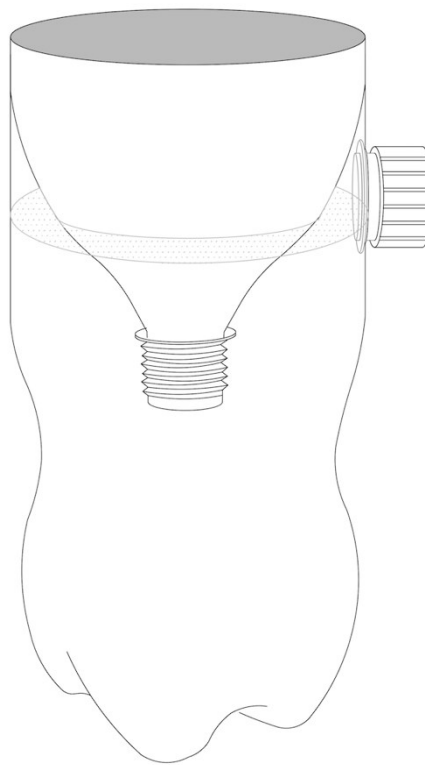
**Entomological survey:**

As a first stage, a one-month entomological survey was carried out. Ovitrap were installed in the first week, and during the following three weeks, reeds were removed and eggs were counted; houses with reeds containing more than 10 eggs for two consecutive weeks were considered positive and constituted the sample residences. Ovitrap were weekly inspected and eggs collected in the paddles were counted under a magnifying glass in the laboratory. The paddles were replaced at each visit and the containers were washed with a sponge and neutral detergent. The ovitrap were placed in dark, strategic areas with constant movement of people, away from stoves or smoke, in houses where people declared they did not use insecticides, on 100 sites selected with help of Endemics Control Officers.

Trap design:

PET traps for larval retention from oviposition were assembled with disposable PET bottles (2L), 34 cm long and 10cm wide, with the upper cone-shaped part inverted into the container (Figure 2). The resulting funnel at the top was painted with black synthetic enamel and fine sand and its bottleneck covered with nylon organza. The final cost of the trap was less than 3.00 BRL each. To make the traps attractive for oviposition, they were filled with water, thereby creating a dark, rough surface funnel with still water. Oviposition within the trap occurs immediately above the water level, on the inner face of the funnel. The larvae descend through the screen installed on the lid to feed on the bottom of the trap, but climb up the sides to breathe in the water-free trapped space. Neither the larvae or the adult forms can escape the trap because of the organza fabric in the cap hole and the geometry of the bottle.

Figure 2: PET trap. The top cone of a 2L bottle is cut, inverted and glued to its bottom. An additional bottleneck is installed on the side wall for water supply. The funnel resulting from inverting the bottle is painted black and made rough by adding fine sand. A nylon organza screen was installed in the inverted bottleneck to prevent the return of larvae to the funnel.

**Trap installation:**

Two weeks before any interventions, each house in the studied district was visited by two project members accompanied by health workers. Residents were briefed on Dengue, Zika and Chikungunya fevers, vector biology, and *A. aegypti* control methods to be deployed in the study, using official government informational materials for support. After receiving consent to proceed, the project team searched within the house for containers, jars, and other objects containing water and infested with larval forms, showing them to the residents as they were found. Mosquitoes were removed, the water was discarded, and the containers were removed or destroyed as part of the cleaning campaign. Residents were informed about the re-inspection schedule.

To detect the presence of *A. aegypti*, ovitraps were used for indirect measurement of home infestation, since they are a sensitive and rapid method, also capable of detecting small variations in vector density⁽¹⁶⁾. The ovitraps consisted of 500mL black plastic vessels containing water and a wood-based paddle (13.5cm long, 2.5cm wide, Eucatex, Botucatu, Brazil), whose rough part faced the center of the vessel.

Trap Assessment

After the entomological survey, efficiency of the PET traps in reducing indoor infestation of *A. aegypti* was assessed. This evaluation included 49 houses monitored by ovitraps; in half of them (sample houses), both PET traps and ovitraps were installed, while the remaining control houses had ovitraps only. Houses were chosen among those considered positive in the entomological survey, following the suggestion of local endemic agents, and were separated from each other by at least 30 meters. Criteria for exclusion of houses were: stock of chemicals (soap, bleach, gas, fuels, etc.), presence of wood-burning stoves, exposure to external repellents (smoke from bakeries, car-washing facilities or other sources), presence of indoor cats, puppies or pregnant bitches. A set of four traps (tied with adhesive tape) per 60m² of constructed area was arranged in each index house. Traps were filled with tap water from the household. The control houses were similarly selected in the other blocks, except for one block where one side had index houses and the other had control houses (see Figure 1). Weekly visits were made for recollection of ovitrap paddles, verification of PET traps and analysis of preestablished criteria. Monitoring was maintained for two months and then new

PET traps were installed, doubling their number. Evaporated water was replaced every 15 to 30 days to avoid drying out of the oviposition funnels.

For 13 weeks, paddles were changed from PET (P) and control (ovitraps; O) traps. The first phase lasted 9 weeks with 22 sample houses and 27 control houses. Each sample residence received four devices in the first phase. Then the traps in the control area doubled, initiating the second phase, which lasted four weeks. In this phase the same number of sample and control houses were used, namely 22.

Traps were not analyzed throughout the year because the rate of *Aedes* infestation declines considerably in the dry season. The presence of intra-domiciliary *A. aegypti* in Patos is similar to that of Barreiras (State of Bahia, Brazil), which shares the same climate, and is only significant when rainfall and humidity indexes are higher, especially between January and March ⁽¹⁷⁾.

Statistical analysis

Statistical analysis comprised two distinct groups, considering the first stage with four and the second stage with eight traps per house. At first, data normality (egg count) was verified using the Shapiro-Wilk test. As the distribution was not normal, the median and the interquartile ranges were calculated, and the Mann-Whitney test was used to evaluate the variation among group medians. Data was analyzed with the R Statistical Software ⁽¹⁸⁾.

Results

High dispersion of *Aedes* eggs (90% of the positive houses during the entomological survey) and distribution of eggs (ranging from 1 to 600

eggs/ovitraps) allowed random use of the area in this experiment. The mean egg counts in the paddles during the three weeks were 28.1, 30.9 and 24.4.

The egg counts in index and control houses during the first 9 weeks (first phase) added up to 15,384 eggs in 49 ovitraps (listed in Supplementary Materials Table I). After week 9, plastic traps were added to reach 8 traps per house, initiating the second phase. The counts in this phase totaled 4337 eggs of 49 ovitraps in the two groups (listed in Supplementary Materials – Table II). The median and the interquartile range for egg counts per period and per group are shown in Table I. No difference between groups were observed in the two phases.

Table I. Median $\pm$ interquartile range for *A. aegypti* egg counts according to experimental phase and group

Phase	Group		<i>P</i> Value
	Only ovitraps	PET/ovitraps	
1	32.0 $\pm$ 32.5	27.8 $\pm$ 22.1	0.510
2	15.0 $\pm$ 26.1	15.4 $\pm$ 30.8	0.881

Tables II and III display the results for egg counts in the first and second phases, respectively, for each experimental group. In both phases and for all weeks no statistical difference ($P > 0.05$) was observed between groups.

Table II. Median $\pm$ interquartile range for *A. aegypti* egg counts during the first phase, according to group and week of counting

Group	Week								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

With PET			17 ±				15 ±	23 ±	11 ±
traps	6.5 ± 30,2	17.5 ± 38,2	36.5	10.5 ± 35.5	20.5 ± 63.7	26.5 ± 45.5	51,5	54.7	26.5
Only									
ovitraps	11±67	17±41.5	20±45	10±42.5	19±39	17±46.5	21±71	20±45	8±28.5

Table III. Median ± interquartile range for *A. aegypti* egg counts during the second phase, according to group and week of counting

Group	Week			
	1	2	3	4
With PET traps	4±44.2	11±29.2	9±39.2	5±22.7
Only ovitraps	0±10	22±36	6±30.5	3±30

Discussion

In the present study, which is the first to evaluate the effectiveness of PET traps in reducing indoor infestation of *Aedes* mosquitoes, it was clear that oviposition in ovitraps did not decrease, despite the large number of specimens retained in the PET traps. This is a strong evidence that number of females free to lay eggs did not experience a significant decrease. This apparent paradox can be explained by the presence of cryptic breeding sites ⁽¹⁹⁾, which are sources of water attractive to mosquitoes but hidden from the researcher eyes. Cryptic breeding sites have been recognized as important sources of *A. aegypti* ^(20,21) and are represented in the studied area by water tanks above toilets, troughs, slabs and other places of difficult inspection. Neglect towards locating and eliminating these breeding sites may

seriously compromise vector control programs and prevent strategies such as using traps and other attraction systems for catching adults or eggs.

Methodological differences between this and other trapping experiments, particularly the lack of attractive traits in the traps used in this study, make comparisons with other assessments difficult. For investigations carried out directly with residents, it is not feasible to use attractive substances that have an unpleasant or penetrating smell, nor light or CO₂ emission systems that depend on the house's power supply. In practice, any trap that succeeds must overcome these limitations, hence our decision to use only water. Indeed, for *Aedes* females, the water vapor gradient emanating from the funnels of the traps is sufficient to attract them ⁽²²⁾ and assure oviposition.

In spite of been attractive, the traps did not seem to reduce vector density. Degener et al ⁽²³⁾ tested the “Mosquitrap” commercial device, which captures pregnant females, using visual and olfactory attractions. They showed that this trap does not reduce numbers of *Aedes aegypti*, thus recommending its use only for mosquito monitoring. Santos et al. ⁽²⁴⁾ reached the same conclusion after testing “*Aedes* Trap”, a device based on sticky tapes, in a neighborhood for 4 months, divided into 4 cycles. Ocampo et al. ⁽²⁵⁾ evaluated lethal ovitraps as means of *Aedes aegypti* capture compared to the use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (*Bti*) and with health education and empowerment of the population as control. They used four neighborhoods: the first received lethal ovitraps, the second received *Bti*, the third received both ovitraps and *Bti*, and the fourth received only health education. The authors concluded that the traps were unable to reduce levels of home infestation. Rapley et al. ⁽²⁶⁾ reached the same conclusion when they employed a number of traps per household similar to that employed here. The same authors, however,

suggest that traps may be useful in controlling in-home populations of *Aedes* if a large number of traps per household are used. Finally, the review study by Johnson, Ritchie, and Fonseca ⁽²⁷⁾ showed that, for traps to be successful, strategies must include high coverage, comprising at least 80% of houses; pre-intervention campaigns and/or reduction of other water sources that may compete with the traps; direct community involvement for long-term sustainability; and using larger traps to compete and overcome the remaining water containers. None of these prerogatives is feasible in the Brazilian endemic areas for *Aedes aegypti*.

The large numbers of both adults and larvae in the PET traps is remarkable and encourage the resident to use them, believing that there will be a reduction in infestation, which is here demonstrated to be wrong. Efficacy assessments are crucial for both homemade and commercially-sold devices, since the apparent discrepancy between efficiency in catching insects and ineffectiveness in reducing insect density in the household is not easily understood by the public. The absence of government regulation or inspection allows for free public use of artisan traps or of those acquired from manufacturers and importers. It is not a matter of limiting private initiative, but of avoiding that the public's attention deviates from attitudes that help controlling the vector and focuses instead in apparently valid actions that are ineffective when evaluated with the necessary rigor. In fact, regulation of technology itself should not be a goal, but may be necessary in ensuring public health and protecting the environment. On the other hand, the lack of regulation can lead to considerable damage ⁽²⁸⁾.

Adopting PET-based or similar traps for vector control bumps into other obstacles, in addition to competition with cryptic breeding sites. Although there is consensus in Public Health about the need for population engagement in *Aedes*

control programs, it is not surprising that the interruption of initiatives, which is frequent in many municipalities, results in population denial and resistance to engage in the programs. In addition, a low educational level that prevails in the population make it difficult for residents to understand control strategies ⁽²⁹⁾ , so using long-term traps becomes impracticable, regardless of whether they are donated, handcrafted, or acquired. It is not feasible to pass this responsibility on to the Endemics Control workers, since they are already overworked. The very high coverage required for successful use of traps would also run counter to the historical problem of closed houses during inspections, which could delay water replenishment and lead to a consequent reduction in egg capture and insect retention.

The traps could be used as vector-monitoring tools, as they only need water replenishments every 15 days or longer, and do not allow the escape of larvae or adults. In addition, the presence of trapped mosquitoes attracts attention from the community, a fact that could be used to improve their effective participation in *Aedes* control programs through health education and awareness of the resident's role as an active part in the fight against the insect.

Conclusions

The study shows that the PET traps do not effectively reduce intra-household populations of *Aedes aegypti*. However, they can be used as monitoring and health education tools.

Acknowledgements

We thank the residents of the Nova Conquista neighborhood who participated in the research, the colleagues who helped with field work (Selismar, Jonilson, Erika

and Norma) and the employees of the Epidemiological Surveillance at the city of Patos/PB.

Financial disclosure

This work received funding from CAPES, CNPq and from TargetDNA.

Author Contributions

Conceptualization: Marília and Paulo; Field work: Marília, Mirele, Guilherme, Ideraldo and Emília; Statistical analysis: Sérgio; Writing – original draft: Marília and Paulo; Review & editing: Marília, Paulo, Éderson and Sérgio

References

1. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo De Investigação De Óbitos Por Arbovírus Urbanos No Brasil – Dengue , Chikungunya E Zika. 2016;35.
Disponível em:
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/30/Protocolo-de-investiga----o-de---bitos-de-dengue-chikv--Zika.13.06.2016.pdf>
2. Cavalcante, KLJ, Tauil, PL. Risk of re-emergence of urban yellow fever in Brazil. Epidemiol. Serv. Saúde. 2017 Jul-Sep , 26 (3). Doi:
<https://doi.org/10.5123/S1679-49742017000300018>
3. Zara ALSA, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidemiol. Serv. Saúde. 2016;25(2): 391:404. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000200017>.
4. Regis LN, Acioli RV, Silveira JC, Melo-Santos MAV, Souza WV, Ribeiro CMN, et al. Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an

- Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities. PLoS One. 2013; 8(7): e67682. doi:10.1371/journal.pone.0067682
5. Sithiprasasna R, Mahapibul P, Noigamol C, Perich MJ, Zeichner BC, Burge B, et al. Field evaluation of a lethal ovitrap for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. J Med Entomol. 2003 Jul;40(4):455-62. Doi: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.455>
 6. Perich, M. J., Kardec, A. , Braga, I. A., Portal, I. F., Burge, R. , Zeichner, B. C., Brogdon, W. A. and Wirtz, R. A. (2003), Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vectors in Brazil. Medical and Veterinary Entomology. 2003, 17: 205-210. doi:[10.1046/j.1365-2915.2003.00427.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00427.x)
 7. Barrera, R.; Amador, M.; Acevedo, V.; Hemme, R.R.; Félix, G. Sustained, area-wide control of *Aedes aegypti* using CDC autocidal gravid ovitraps. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2014, 91, 1269–1276. DOI: 10.4269 / ajtmh.14-0426.
 8. Cavalcanti LPDG, Pontes RJS, Regazzi ACF, de Paula Júnior FJ, Frutuoso RL, Sousa EP, et al. Efficacy of fish as predators of *Aedes aegypti* larvae, under laboratory conditions. Rev Saude Publica [Internet]. 2007; 41(4):638–44. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006005000041>
 9. Serpa LLN, Arduino MB, Marques GRAM, Ramos DG. Dengue prevention: implications of the meshes used in household water reservoirs for *Aedes aegypti* control. Bol. epidemiol. paul. [online]. 2010, 7(80): 04-09. Available from:https://www.researchgate.net/profile/Marylene_Arduino/publication/262495628_Dengue_prevention_implications_of_the_meshes_used_in_household_water_reservoirs_for_Aedes_aegypti_control/links/00b49537dfe386d7cb000000/Dengue-prevention-implications-of-the-meshes-used-in-household-water-reservoirs-for-Aedes-aegypti-control.pdf [Cited 2018-06-18]

10. Armadilha para mosquito. Available from:
http://nsbao.com.br/armadilha_para_mosquito.html [Cited in Jun 20 2018].
11. Mini Mosquito. Available from: (https://www.polishop.com.br/mini-mosquito-trap/p?idsku=114637&utm_source=gshop&utm_campaign=pla&utm_medium=cpc&gclid=EAIaIQobChMI8PaFvtDG2wIVxweRCh02QwfuEAQYASABEglJePD_BwE) [Cited in Jun 20 2018].
12. Lâmpada LED Mata-mosquito. Available from: (https://br.gearbest.com/other-garden-supplies/pp_1828304.html?wid=1433363¤cy=BRL&vip=4282154&gclid=EAIaIQobChMI8PaFvtDG2wIVxweRCh02QwfuEAQYAiABEgl2tfD_BwE) [Cited in Jun 20 2018].
13. Armadilha De Mosquito C/Ventilador. Available from:
https://www.americanas.com.br/produto/31085902/armadilha-de-mosquito-c-ventilador-v-mart-01-220v-general-heater?WT.srch=1&epar=bp_pl_00_go_bs_todas_geral_gmv&gclid=EAIaIQobChMI8PaFvtDG2wIVxweRCh02QwfuEAQYAYABEgJBQPD_BwE&opn=YSME SP&sellerId=26107827000192) [Cited in Jun 20 2018].
14. Armadilha letal para mosquitos, temperada com atitude de civilidade Available from: <http://www.faperj.br/downloads/mosquiterica.pdf> [Cited in Jun 20 2018].
15. Especialistas alertam contra armadilha caseira de *Aedes*. Available from:
http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2016/02/160204_armadilha_mosquito_1k) [Cited in Jun 20 2018].
16. Acioli RV. O uso de armadilhas de oviposição (ovitrampas) como ferramenta para monitoramento populacional do *Aedes* spp em bairros do Recife. (Tese de Doutorado). Recife, Brasil: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães,

- Fundação Oswaldo Cruz; 2006. Available from:
<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2006acioli-rv.pdf>
17. Costa, IMP, e Calado, DC. Incidence of dengue cases (2007-2013) and seasonal distribution of mosquitoes (Diptera: Culicidae) (2012- 2013) in Barreiras, Bahia, Brazil. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, 25(4), Oct-Dec 2016
 DOI: 10.5123/S1679-49742016000400007
 18. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL Available from:
<https://www.R-project.org/> [Cited in Jun 20 2018].
 19. Dieng H, Saifur RGM, Ahmad AH, Salmah MRC, Aziz AT, Satho T, et al. Unusual developing sites of dengue vectors and potential epidemiological implications. Asian Pac J Trop Biomed. 2012 Mar; 2(3): 228-232.
 Doi:10.1016/S2221-1691(12)60047-1
 20. Ritchie SA, Jeffrey N, Hanna JN, Hills SL, Piispanen JP, McBride WJH, Pyke A Spark RL. Dengue Control in North Queensland, Australia: Case Recognition and Selective Indoor Residual Spraying. Dengue Bull. 2002, 26:7-13. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/163762> [Cited in Jun 20 2018].
 21. Pilger D, Lenhart A, Manrique-Saide P, Siqueira JB, Rocha WT, Kroeger A. Is routine dengue vector surveillance in central Brazil able to accurately monitor the *Aedes aegypti* population? Results from a pupal productivity survey. Trop Med Intl Health. 2011 Sep;16(9):1143-50. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02818.x>
 22. Kellogg FE. Water vapor and carbon dioxide receptors in *Aedes aegypti*. J Insect Physiol. 1970, 16: 99 - 108. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191070901174> [Cited in Jun 20 2018].
23. Degener CM, de Ázara TMF, Roque RA, Rösner S, Rocha ESO, Kroon EG, et al. Mass trapping with mosquiTRAPs does not reduce *Aedes aegypti* abundance. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(4):517–27. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140374>
 24. Santos, EMM, Melo-Santos MAV, Oliveira CMF, Correia JC, Albuquerque, CMR. Evaluation of a sticky trap (*Aedes*TraP), made from disposable plastic bottles , as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations. Parasites & Vectors 2012, 5:195. Doi: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-195>
 25. Ocampo CB, González C, Morales CA, Pérez M, Wesson D, Apperson CS. Evaluation of community-based strategies for *Aedes aegypti* control inside houses. Biomedica [Internet]. 2009; 29(2):282–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128353> (Cited in 10.06.2018)
 26. Rapley LP, Johnson PH, Williams CR, Silcock RM, Larkman M, Long SA, Russel RC, Ritchie SA (2009). A lethal ovitrap-based mass trapping scheme for dengue control in Australia: II. Impact on populations of the mosquito *Aedes aegypti*. Med Vet Entomol. 2009 Dec; 23(4):303-16. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00834.x>
 27. Johnson BJ, Ritchie SA, Fonseca DM. The state of the art of lethal oviposition trap-based mass interventions for arboviral control. Insects. 2017;8 (1):1–16. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/insects8010005>
 28. Braun, E. PROMOTE OR REGULATE: THE DILEMMA OF INNOVATION POLICY. In Technology Policy: Towards an Integration of Social and

Ecological Concerns. Pgs 46-63. Edit. G. Aichholzer and G Schienstock.

Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 2010, 432 pp

29. Chiaravalloti -Neto F, Baglini, V, Cesarino, MB, Favaro, EA, Mondini A, Ferreira AC, et al. Dengue Control Program in São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil: problems with health agents' work and population adherence. *Cad. Saúde Pública*. 2007, JUL, ;23(7):1656–64. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007000700017>

Table 1. Egg counts in ovitraps from houses with PET traps (P) or without them (O), during 9 weeks (Roman digits), according to the block and house (Quart.**SMS**), in the Nova Conquista community, city of Patos, PB, Brazil.

*Mean: mean egg counting for the week

**Install: Installation of trap devices

***Des: Residents refused to continue cooperating in the project

Quart.SMS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Mean*	T
-----------	---	----	-----	----	---	----	-----	------	----	-------	---

18.16.1	-	Install**	0	28	0	0	0	36	0	7	P
21.1	0	14	5	3	0	39	0	12	0	8	P
18.6	0	6	22	0	13	7	14	18	0	9	P
24.48	31	16	0	0	0	7	6	0	21	9	P
18.1	0	0	72	0	14	2	0	0	0	10	P
22.37	14	15	14	19	7	2	5	3	11	10	P
16.4	-	install	23	39	1	17	4	12	0	11	P
23.14	3	0	9	0	19	67	0	28	0	14	P
24.13	45	53	3	0	14	1	22	3	0	16	P
21.3	0	53	20	0	6	39	11	11	2	16	P
24.69	9	0	21	23	70	43	Des***	des	des	18	P
18.12	-	install	64	15	7	18	0	71	0	19	P
22.44	50	0	13	61	4	26	16	13	0	20	P
22.30.1	0	0	0	0	58	140	53	0	0	28	P
22.28	0	12	43	30	22	76	6	46	22	29	P
22.2	66	1	2	37	77	27	60	1	11	31	P
24.6	28	136	5	73	13	16	10	8	7	33	P
24.19	0	7	37	31	41	30	9	84	70	34	P
18.4	4	25	61	7	39	20	94	53	12	35	P
22.7	10	53	29	13	94	60	11	34	21	36	P
24.34	0	19	0	20	93	22	98	72	11	37	P
23.24	0	22	45	42	82	33	53	61	71	45	P
21.20	9	172	113	45	0	16	23	61	28	52	P
23.29	27	26	22	0	27	174	132	45	63	57	P
23.37	50	28	87	76	78	0	62	97	218	77	P
17.8	60	50	11	8	138	236	214	196	113	114	P
07.16	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	O
19.23	0	0	0	0	3	0	0	18	0	2	O
19.4	11	8	0	10	7	0	11	0	0	5	O
24.1	0	0	0	1	15	30	5	0	0	6	O
19.1	5	31	1	0	19	0	0	0	0	6	O
13.1	0	0		46	1	0	0	13	24	9	O
20.06	66	0	0	1	16	17	0	0	0	11	O
07.32	0	65	0	4	0	14	0	0	17	11	O
06.9	0	8	36	45	38	27	0	0	0	17	O
13.21	0	0	0	10	3	11	61	46	54	21	O
19.8	63	13	19	42	0	0	21	36	0	22	O
19.29	0	39	0	8	13	24	105	29	8	25	O
07.02	130	6	54	23	20	6	7	6	4	28	O

06.12.1	0	23	87	6	23	16	65	13	46	31	O
13.7	8	0	25	24	84	37	36	51	32	33	O
20.17.2	0	87	29	18	15	43	0	55	76	36	O
16.1	11	9	104	45	32	59	36	30	12	38	O
06.17	0	72	27	33	95	8	120	5	8	41	O
13.13	11	41	97	18	77	9	73	60	0	43	O
06.4	110	13	24	0	2	71	12	173	0	45	O
13.23	200	66	98	0	29	3	10	0	0	45	O
07.26.1	13	40	93	0	35	185	70	38	25	55	O
07.38	68	48	18	0	129	91	72	38	41	56	O
06.34.3	93	29	20	57	83	106	107	20	0	57	O
20.27	178	87	1	44	50	30	119	44	16	63	O
17.10	14	17	30	103	16	217	55	164	32	72	O
06.21	215	200	181	145	121	130	141	103	145	153	O

Table 2. Egg counts in ovitraps from houses with PET traps (P) or without them (O), during 4 weeks – second phase - (Roman digits), according to the block and house (**Quart, SMS**), in the Nova Conquista community, city of Patos, PB, Brazil.

Quart.SMS	I	II	III	IV	T
6	15	11	10	18	A
24,13	3	11	5	0	P
24,19	0	31	25	0	P
24,34	27	32	46	0	P
24,48	0	0	8	5	P
21,3	11	9	des	des	P
18,4	1	23	52	0	P
23,14	0	0	0	5	P
23,24	10	1	2	0	P
23,29	86	0	27	53	P
23,36	77	0	35	25	P
22,30,1	1	0	0	0	P
22,37	42	92	44	23	P
22,44	0	27	40	0	P
22,2	58	0	0	87	P

Quart.SMS	I	II	III	IV	A
22,7	0	30	68	40	P
18,6	0	0	0	0	P
17,8	66	113	116	141	P
21,2	71	0	0	5	P
18,16,1	0	0	0	0	P
18,12	0	24	0	8	P
16,4	45	74	0	22	P
25,1	5	18	37	0	P
24,1	0	0	0	0	O
20,06	0	28	0	0	O
20,17,2	0	0	35	0	O
20,27	45	14	21	97	O
19,4	0	0	0	0	O
19,8	26	31	39	4	O
19,23	0	0	29	87	O
19,29	0	29	37	24	O
7,16	0	0	0	0	O
7,02	3	0	10	29	O
7,38	0	127	15	31	O
7,32	0	0	0	0	O
07,26,1	9	20	15	0	O
6,17	0	32	0	0	O
06,12,1	6	25	6	23	O
6,9	0	0	4	71	O
6,4	36	134	32	115	O
06,34,3	0	0	3	0	O
13,21	0	22	0	0	O
13,23	0	65	39	22	O
13,7	132	88	0	75	O
13,13	5	25	10	74	O

16,1	72	43	59	3	O
21,1	0	0	0	0	O
6,21	73	119	80	0	O
13,1	11	0	0	0	O

ARTIGO 2 - Underreporting in known and new epidemics: lessons derived from the analysis of an outbreak of dengue, zika and chikungunya in a community in Brazil

Marília Andreza da Silva Ferreira

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, RECIFE, Pernambuco, Brazil, 50670-901

Mirele Adriana da Silva Ferreira

Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brazil

Jonilson Pereira da Silva.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Marcia Almeida de Melo

Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brazil

Ederson Akio Kido

Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Paulo Paes de Andrade

Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Running title:

Underreporting of arboviral diseases in Brazil

Abstract

Objective To estimate the underreporting rate of Dengue fever, Zika and Chikungunya in a community in Brazil in 2016, when the country was plagued by a triple viral epidemic, as well as to analyze their cause, general characteristics and possible impact on the country's healthcare system.

Methods A cross-sectional study was carried out within a neighborhood with high vector density. Case numbers of the three infections obtained through self-declarations were compared with those registered in the national reporting system. Underreporting estimates and their causes in the community were obtained and compared to the literature.

Findings 343 people were interviewed, of whom 229 reported having been affected by at least one of the three arboviruses. No cases were reported as Zika or

Chikungunya in the official surveillance system and only 15 cases were reported as Dengue. The total underreporting of Dengue fever was 93.8% and the expansion factor was 16.3. For Zika and Chikungunya fevers, underreporting was 100%. Several causes for underreporting were identified, many of them anchored in the social and economic reality in Brazil and in other countries for which similar research was available. Underreporting also appears to be more severe when an outbreak of a disease occurs for the first time in the country.

Conclusions There is an urgent need to revise the notification system by including a permanent oversight mechanism and audits in various instances, what seems to extend to many other developing countries.

Introduction

Appropriate control of large epidemics relies on information that can be used as a starting point to assess the severity of the situation and plan a suitable response¹. In Brazil, the Unified Health System (Sistema Único de Saúde – SUS) addresses public health, but allows for decentralization in many instances, including case reporting. Epidemiological Surveillance is decentralized at state and city levels and addresses official registration of diseases, infectious or otherwise, through data collection and processing. It is also responsible for evaluating and controlling the effectiveness of ongoing operations. The chain of events and responsibilities linking the record of a suspected case at a local health facility to the confirmation of its etiology at the federal level is complex and subject to errors, despite the existence of quality assessment mechanisms in several stages (see Box 1). When failures accumulate at various points, the responsiveness of the system is reduced as a whole². In 2016, Brazil went through a public health emergency caused by a triad of viral epidemics, namely Dengue, Zika and Chikungunya fevers³. Although Dengue had been circulating in the country for many decades, Chikungunya was relatively recent and little-known, while Zika was entirely new to most health professionals in the country. The objectives of this study were: a) to estimate the underreporting degree of these three viral diseases by comparing self-reported cases with the official 2016 records of SINAN (National Medical Attention System) in a neighborhood of the city of Patos, Paraíba state, in Northeastern Brazil; b) to relate the probable causes of underreporting in the neighborhood with those reported in other studies, identifying indications of potential managerial and organizational failures within the notification

system and c) to discuss the probable impact of high underreporting rates in the medical assistance available for the local population and for other populations subject to a similar degree of deficiency in disease quantification, even in cases for which notification is compulsory.

Methodology

This is a cross-sectional study with residents of a neighborhood in the city of Patos (PB), Brazil, conducted in June 2016. The data collection period coincided with the triple viral epidemic that occurred in the country in 2016. A questionnaire was used as data collection tool, aiming to identify the resident, the number of residents per household, the diseases that affected interviewees and whether they sought health services. The inquiry was carried out in Nova Conquista neighborhood – also known as Mutirão – Patos city, State of Paraíba, Brazil. This municipality is an important commercial center, and the third largest city of the State of Paraíba in terms of population and economic development. Patos is also in an area of regional road intersections linking several cities in the hinterlands of the states of Paraíba, Ceará, Pernambuco and Rio Grande do Norte. The local climate is tropical, with lower rainfall in winter than in summer, average annual rainfall of 728 mm and average temperature of 25.5 ° C. The climate is classified as Aw (tropical with dry winter season) according to the Köppen–Geiger climate classification system ⁴.

The neighborhood (-7.0631942 °, -37.2841915 °) is located in the outskirts of the city, with approximately 1000 houses, a population of poorly educated, low-income residents, high rates of *Aedes aegypti* infestation ⁵, and precarious conditions of sanitation and water supply. A total of 100 houses with a gap of approximately 30 m (based on the flight range of the mosquito) were selected, considering the inclusion-exclusion principle. The inclusion criterion was that the resident must reside in the neighborhood; exclusion criteria: closed houses, with residents who were not able to provide the required data or presence of minors without an Informed Consent Statement (ICS) signed by the parents or legal guardians. After determining the target houses, residents were informed about the research and the data collection procedure. Those who agreed to participate and who signed the ICS were then asked to answer a questionnaire. Whenever the subjects had questions, they were answered during and after filling in the form. The answers were recorded in the questionnaire (supplementary material) by the researchers and contained open-

ended questions to identify cases of Dengue, Chikungunya and Zika fevers, and to inquire about the search for health services. Identification of the signals and symptoms was done by self-declaration and aided by figures containing signals of the three infections of interest ⁶. The bias inherent to this sort of diagnostic system was considered small because of the general severity of the diseases and the engagement of the participants in the research.

The collected data were analyzed in Microsoft Excel spreadsheets. For each virus, we estimated the percentage of underreporting by absentees (AU), percentage of institutional underreporting (IU), and percentage of total underreporting (TU). The IU was calculated as the difference between the number of self-reported cases seeking medical services and the number of cases officially reported in that area, in relation to the number of the total number of self-reported cases; this index was then calculated as percentage. The AU was calculated as the ratio between the number of self-reported cases not seeking health services and the number of self-reported cases, also calculated as percentage. Finally, TU was the sum of IU and AU.

The expansion factor (EF) was calculated as the number that should multiply the reported cases to reach the estimated cases. For this purpose, the estimate number of cases was the product of the number of cases reported in the neighborhood in SINAN ⁷ by the ratio of sampled houses (90/1000).

The methodology to assess the SINAN was based on the Guidelines for Evaluating Public Health Surveillance Systems ⁸ and also followed the standards for cohort studies proposed by EQUATOR ⁹. The following formula was used for sampling calculations, with N corresponding to sample size, e representing the error margin, and z the score.

$$\frac{\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2}}{1 + \left(\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2 N} \right)}$$

Considering that the studied location has approximately 3600 inhabitants, a sample calculation with 95% confidence level and 10% margin of error indicates that the sample population should comprise at least 348 people.

The study was conducted based on Resolution 466/2012 of the National Health Council and its implementation was approved by the National Committee for Ethics in Research (CONEP) under the code number CAAE 56588116.0.0000.

Results

A total of 343 people from 90 homes were interviewed. Among residents, 229 reported illnesses related to one or more of the studied arboviruses, and 9 individuals developed symptoms corresponding to two different types of arboviruses, as indicated in Table 1. However, all cases in the neighborhood were officially reported as Dengue fever.

Table 1: Information obtained via questionnaire answers from 343 residents of 90 houses in Nova Conquista neighborhood, Patos/PB, between January and June of 2016.

Characteristics	Numbers
Inhabitants	343
Self-reported cases	229
People with two concomitant viral diseases	9
Mean number of cases per household	2,54
Total number of cases officially reported in the neighborhood	15
Cases reported in the working area	1,35
Mean number of residents per household	3,81
Houses selected for survey	100
Closed houses	10
Households surveyed	90
Households with cases	87
Households without cases	3

During data collection, 10% of the houses were closed at the time of the interviews, demonstrating that absence of residents has an impact on public health services, since they depend on routine visits, active search and epidemiological investigation. Only three residences were free of self-reported cases.

Table 2 shows that there were more cases of Chikungunya fever in the area than the other two diseases. Many residents presented during this survey arthralgia,

the characteristic symptom for aiding differential diagnosis. Within the sampled population, 64.1% reported symptoms compatible with one of the three infections: 50% reported symptoms compatible with Chikungunya, 9% with Zika, and 5.4% with Dengue fever.

Table 2. Distribution of the three arboviral infections among residents of the Mutirão neighborhood (Nova Conquista), Patos, PB, Brazil, between January and June of 2016.

Disease	Total
Chikungunya	172
Zika	35
Dengue	22
Studied population	343

Residents were asked about their seeking for health services. Among the 220 people affected, only 125 (57%) sought support from a health unit. Those who sought medical services, attended the neighborhood public clinic, easily accessible to residents. However, most residents complained of long queues, absence of laboratory tests, unspecified diagnosis of “viral infection”, demand for clinical services beyond the usual and lack of medication for the symptoms they had. Among those who did not seek medical services, the answers presented were: a) diagnosis and treatment were inferred by other people home or in the neighborhood, who had experienced the same symptoms; b) milder symptoms of the disease; c) were unable to get medical attention in other occasions.

SINAN notification searches in the municipality of Patos show that in the health unit of the Nova Conquista neighborhood there were only 15 suspected cases of Dengue during the whole period of the survey, and all were reported as inconclusive (when clinical investigation was not complete). No cases were reported as Chikungunya or Zika. The percentages of underreporting and the expansion factor for dengue were: AU = 45.4%, IU = 48.4%, UT = 93.8% and EF = 16.3. For the other studied diseases, underreporting was 100%, in a scenario in which only a little more than half of the inhabitants sought health services.

Discussion

The number of self-declared cases of the three infections was very high, as was the underreporting rate. It is necessary to evaluate whether these high numbers correlate with some specific characteristic of the inquired location. The study area is home to a largely poor, ill educated population with inadequate water supply and sanitation, lack of regular trash collection, and high vector density during the period studied. These characteristics are similar to those of many other places where underreporting has been documented, both in Brazil and abroad, such as in Cali – Colombia ¹⁰, Girardot – Colombia ¹¹, Quelimane – Mozambique ¹² and Belo Horizonte – Brazil ¹³. In these studies, the underreporting degree was sometimes very high.

In a meta-analysis ¹⁴, it was showed that underreporting rates and expansion factors may be high in many developing countries, often higher than those found here for Dengue. This indicates that underreporting of diseases in epidemic periods is not restricted to the community studied, nor to Brazil. It is, in fact, a reality in countries with similar systems of basic healthcare structure. The comparison between the number of Dengue cases in 2010 recognized by WHO (2.2 million) and based on official notifications and case estimates (9.6 million) for the same year ¹⁵ indicates an expansion factor (EF) of 43.6, consistent with the estimates of ¹⁴ for several regions of the world, as well as with those of a study ¹⁶ for Dengue in Brazil and with the value calculated for the area studied here. In conclusion, Dengue may be considered as underreported both globally and in Brazil: despite the efforts by the National Directives for the Prevention and Control of Dengue Epidemics ¹⁷, reporting is still below the level necessary for effective control of this endemic disease.

Moreover, our results show absolute underreporting of Chikungunya and Zika, although the number of cases was much higher than those of Dengue fever. This is probably due to inexperience among health professionals regarding these two infections, whose epidemics only began in the country. Although there were instructions for differential diagnosis provided by the Ministry of Health and the States through leaflets and websites, healthcare personnel lacked the knowledge to identify Chikungunya and Zika cases effectively. After dozens of cases of microcephaly attributed to Zika virus infection in pregnant women ^{18,19}, enhanced surveillance was performed, as is usually the case for Dengue fever in Brazil ²⁰ and in other countries, leading to an increase in professional and public awareness of the disease. However,

the effectiveness of such measure needs countrywide assessment, as there are still no studies of national scope on underreporting of Zika or Chikungunya.

Although the Brazilian notification system (described in Box 1) seems robust, there are several opportunities for noncompliance with standards or reduction of service quality, potentially leading to underreporting, whose causes vary between different localities within the country and between countries. There are certain common causes that should be highlighted and are detailed in Table 3.

Table 3. Categories, determinants and causal factors of underreporting.

Categories	Determinants	Causal factors
Access to the health system	No seeking of medical attention	Disbelief, lack of transportation, self-medication, deficient mobility, etc... ²¹
Health service quality	Unprepared health personnel	Erroneous or non-existent diagnosis, unawareness of the mandatory character of notification, lack of perception about the relevance of surveilled diseases in public health by professionals, no adherence to notification due to the time taken to fill out the form and absence of feedback on analyzed information with relevant technical recommendations ²³
	Insufficient resources for public health	Insufficient training and coordination of local health teams by the Sanitary Surveillance department, worsening of public services ²² .
	Lack of follow-ups and control	Lack of accountability, inefficient services for the notification procedure, lack of SINAN supervision, lack of audit ²³ .

The main causes of underreporting can be grouped in: lack of demand for health services; errors in the notification process and diagnostic errors. A study ¹¹ on Chikungunya underreporting shows that the most frequent cause for a patient not to seek medical attention is self-medication, which is a result of self-diagnosis by comparing symptoms of relatives and neighbors with those of the patient. The second cause is the collapse in the provision of health services. Underreporting

because of those who do not seek assistance also runs into social and economic issues. Often, patients do not have a formal labor bond, which exempts them from the need to obtain a medical certificate; also, they do not have specific knowledge about the need to attend health services for notification purposes and have a habit of seeking health services only when the symptoms are severe. Additionally, there is the difficulty of walking which is characteristic of Chikungunya fever, the discredit of public healthcare and the fact that ambulances or a private transportation are not always available for the patient to reach a health unit or hospital.

Underreporting due to errors in the notification system is the result of a wide range of factors, starting with the lack of registration of those who arrive in health units. Those involved in the process, mainly doctors and nurses, are usually not committed to the notification system due to lack of training and incentives to perform these activities, as well as low salaries and inadequate working conditions ^{24,25}. The adoption of a sensible system of incentives to those involved in diseases notification, in association to audits and other oversight mechanisms, can help reducing underreporting.

In addition, the reporting system does not have a quality assessment mechanism (auditing and oversight) for rigorous and periodic evaluation. As a consequence, the system can fail even for registering cases of patients who have sought health services and had their symptoms evolve to more severe forms of Dengue, leading to hospitalization ¹³. Oftentimes, the files have incomplete data or contain erroneous information ²⁶. Finally, the high staff turnover, common in primary healthcare in Brazil, reflects the precariousness of employment relationships, which compromises professional training, bonds of accountability and the continuity of activities ²⁷.

Lack of systematic oversight and periodic audits is probably the cause of persistent underreporting. It is noticeable that the country still lacks a culture of evaluating its health systems. However, for the notification system to function properly, there can be no negligence in the evaluation of management and service quality programs ²⁷. A high quality of surveillance data is critical for correctly estimating disease burden and the impact of prevention efforts in a permanent and routinely manner ^{14, 11}. In 2010, the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards Surveillance Working Group suggested that each surveillance system should have a quality assurance system, i.e. the use of periodic capture-recapture tools to

assess under-detection, under-notification and quality of the data generated by the surveillance system²⁸.

In the case of arboviruses, epidemiological surveillance should include entomological surveillance, due to the wide distribution in Brazil and in the World of different populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Both species exhibit high vector competence for carrying Dengue, Zika and Chikungunya viruses²⁹. Despite all efforts to control these vectors in Brazil, the distribution of both mosquito species grew rapidly throughout the country. New technologies may help vector control, either by eliminating the mosquitoes via release of genetically modified individuals³⁰, or by replacing vector populations with mosquitoes that harbor *Wolbachia* bacteria and are therefore refractory to arboviruses³¹. Even if these promises of control are fulfilled, however, epidemiological surveillance will continue to be essential for planning of actions such as vaccination for protection against these arboviruses²⁸ and cannot fall short of timely quality data. Undoubtedly, the greatest challenge in epidemiological surveillance is and will continue to be underreporting.

Underreporting has other developments beyond the failure of epidemiological surveillance, since there are economic impacts associated with all three infections. This is particularly acute in Chikungunya fever, which usually progresses to spontaneous cure, but in many cases, a strong arthralgia progresses into the chronic phase of the disease, interfering with occupational tasks³². No treatment is available, and signs of severe polyarthritis appear in 80% to 90% of patients in the first three months, followed by chronic destructive arthropathy, which impairs capability for simple daily activities, causes employees to take leaves of absence and generates costs that can hardly be estimated when underreporting rates are high. People affected also contribute to increasing demand for medical care, serological tests, drugs and other services that are generally provided by the government³³. Studies assessing this demand for health services were carried out in Réunion Island^{34, 35, 36}. Five years after the end of the Chikungunya epidemic that occurred in 2005-2006, a study³⁴ analyzed its economic impact on public funds. Patients took an average of 8.9 days off, and the cost of painkiller reimbursements was twice as high as expected in the absence of an epidemic, highlighting the burden caused by the outbreak. Such a high degree of underreporting, as observed in the community studied here, stands in the way of accurate evaluations of the economic burden, successful planning of patient care and, ultimately, fundraising by local health service managers. In

conclusion, it is important to evaluate the costs and consider the benefits of effective programs for monitoring, prevention and control of arbovirus-related diseases, which is valid for public health policies anywhere in the world subject to these infections. Finally, undersizing an outbreak also results in loss of federal and state resources for other public health efforts in a municipality, which may be critical for minimizing the impacts of diseases.

Furthermore, deficient official data on compulsorily notifiable diseases may contribute to new epidemics, negatively impacting the epidemiological picture, as evidenced by the case records of Chikungunya in 2017 in the State of Ceará, Brazil. The number of cases quadrupled as the disease declined in the rest of the country in the same period ³⁷.

Conclusions

Underreporting of arbovirus infections can be extensive, even during outbreaks. Based on the results obtained in this study, the adoption of a permanent oversight mechanism and audits in various instances of the notification process is suggested as a first step towards correcting serious distortions of disease notification. This is a need that seems to extend to many other developing countries.

Acknowledgements

We thank the residents of the Nova Conquista neighborhood who participated in the research, the colleagues who helped with field work (Selismar, Guilherme, Ideraldo, Emília, Erika and Norma) and the employees of the Epidemiological Surveillance at the city of Patos/PB, for their aid in obtaining data from the Information System for Notifiable Diseases (SINAN).

Financial disclosure

This work received funding from CAPES, CNPq and from TargetDNA.

Box 1: The notification system in Brazil

The notification system in Brazil is structured in three levels: city, state and federal. There is a list of diseases and health problems with compulsory notification guidelines. Notification of Zika, Dengue and Chikungunya arboviruses must be made

in accordance with Ordinance no. 204, of February 17, 2016 of the Ministry of Health
38

All health professionals must notify the listed diseases within a week, regardless of whether it is a confirmed or suspected case. Reporting must also mention those responsible for the service, be it public or private, and the notification forms must be readily available at care units. Once they have been properly filled in and signed, they should be sent to the divisions responsible for epidemiological surveillance within City Departments. These shall weekly send the digital files to their respective State Departments of Health ²⁶, which then forward the documents within 15 days to the Health Surveillance Department of the Ministry of Health.

The form is only complete when it includes all the information requested (including laboratory diagnosis and case developments). If not filled with all required data, the notified case will be regarded as inconclusive after about 60 days, which is usually the deadline for timely investigation and case completion. The notification is a responsibility shared by all health professionals who are part of the National Primary Care Policy (doctors, nurses, community health officers, endemic disease control officers). Individuals who do not seek health services should be detected by the Primary Care professionals through active search and referred to a healthcare facility, along with the corresponding notification form. When there are no confirmed and/or suspected cases, professionals must inform about the negative records as evidence of their awareness. Failure to comply with these norms for two consecutive months may result in suspension of federal financial transfers to the municipalities for basic healthcare ^{39, 26}.

References

1. Mandyata CB, Olowski LK, Mutale W. Challenges of implementing the integrated disease surveillance and response strategy in Zambia: A health worker perspective. BMC Public Health. 2017;17(1):11.DOI:[10.1016/j.ejim.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.01.009)
2. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2002. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia_vig_epi_vol_I.pdf [Cited 2018 Jun 17]. Portuguese.

3. Valle D, Pimenta D N, Aguiar R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. Epidemiol. Serv. Saude [Internet]. 2016 Apr-Jun; 25(2):419-422. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000200020>
4. Climate-Data.org. Dados climáticos para cidades mundiais. Available from: <https://pt.climate-data.org/location/42575/> [Cited 2018 Jun 17]. Portuguese.
5. Ferreira e cols. Mass Trapping with a plastic lethal trap does not reduce intradomiciliary *Aedes aegypti* abundance. (Manuscript in preparation).
6. Sintomas e diferenças entre dengue, zika e chikungunya. Available from: <http://darcyvargas.com.br/category/noticias/page/4/> [Cited 2018 Jun 17].
7. Information System for Notifiable Diseases. Available from: <http://www.saude.gov.br/sinan> [Cited 2018 Jun 17]. Portuguese.
8. Center for Diseases Control. Updated Guidelines for Evaluating Public Health Surveillance Systems. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5013a1.htm>) [Cited 2018 Jun 17].
9. Equator Network. Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research. Available from: <http://www.equator-network.org/about-us/uk-equator-centre/equator-publications/equator-network-publications-2010/> [Cited 2018 Jun 17].
10. Krystosik AR, Curtis A, Buritica P, Ajayakumar J, Squires R, Dávalos D, et al. Community context and sub-neighborhood scale detail to explain dengue, chikungunya and Zika patterns in Cali, Colombia. PLoS ONE. 2017, 12(8): e0181208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181208>
11. Pacheco Ó, Martínez M, Alarcón Á, Bonilla M, Caycedo A, Valbuena T, et al. Estimación del subregistro de casos de enfermedad por el virus del chikungunya en Girardot, Colombia, noviembre de 2014 a mayo de 2015. Biomédica. 2017, 37 (4); 507-15. Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3370>.
12. Mugabe VA, Ali S, Chelene I, Monteiro VO, Guiliche O, Muianga AF, et al. Evidence for chikungunya and dengue transmission in Quelimane, Mozambique: Results from an investigation of a potential outbreak of chikungunya virus. PLoS ONE. 2018, 13(2): e0192110. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192110>

13. Duarte HHP, França EB. Data quality of dengue epidemiological surveillance in Belo Horizonte, Southeastern Brazil. *Rev Saúde Publica*. 2006;40(1):134–42. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006000100021>
14. Toan NT, Rossi S, Prisco G, Nante N, Viviani S. Dengue epidemiology in selected endemic countries: factors influencing expansion factors as estimates of underreporting. *Trop Med Int Heal*. 2015, Jul; 20(7):840–63. Doi:10.1111/tmi.12498. <http://doi.wiley.com/10.1111/tmi.12498>
15. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>
16. Silva MMO, Rodrigues MS, Paploski IAD, Kikuti M, Kasper AM, Cruz JS, et al. Accuracy of dengue reporting by national surveillance system, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(2):336–9. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2202.150495>
17. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf [Cited 2018 Jun 17]. Portuguese.
18. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jun;16(6):653–60. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
19. De Araújo TVB, Rodrigues LC, Ximenes RAA, Miranda-Filho DB, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(12):1356–63. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30318-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30318-8)
20. Ramos MM, Argüello DF, Luxemburger C, Quiñones L, Muñoz JL, Beatty M, et al. Epidemiological and clinical observations on patients with dengue in Puerto Rico: results from the first year of enhanced surveillance--June 2005-May 2006. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2008;79(1):123–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606775> PMID: 18606775
21. Ribeiro MCSDA, Barata RB, Almeida MF, Silva ZP. Perfil sociodemográfico e padrão de utilização de serviços de saúde para usuários e não-usuários do SUS - PNAD 2003. *Cien. Saúde Colet*. 2006;11(4):1011–22. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232006000400022>

22. Pinheiro RS, Viacava F, Travassos C, Brito A S. Gênero, morbidade, acesso e utilização de serviços de saúde no Brasil. *Cien Saúde Colet* . 2002;7(4):687–707. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232002000400007>
23. Carvalho ADO, Eduardo MBDP. *Sistemas de Informação em Saúde para Municípios*. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. SP, Brazil. 1998. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_cidadania_volume06.pdf
24. Bordoni PHC, Bordoni LS, Silva JM, Drumond EF. Use of capture-recapture method to improve the notification of fatal occupational injuries records in Belo Horizonte city, Minas Gerais State, Brazil, 2011. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2016 Jan-Mar; 25(1): 84-94. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742016000100009>
25. Martínez-Vega RA, Díaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA. Dificultad para el diagnóstico clínico temprano del dengue en un área endémica y su impacto sobre el manejo médico inicial. *Rev Méd Chil*. 2006;134(9):1153–60. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872006000900010>
26. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan: normas e rotinas. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_informacao_agravos_notificacao_sinan.pdf [Cited 2018 Jun 17].
27. Einloft ABN, Araújo RMA, Cotta RMM. Pesquisa qualitativa em avaliação de programas de saúde: emergência de conteúdos e vozes ocultos pela ausência de dados oficiais e subnotificação. In: *Atas CIAIQ, 5º Congresso Ibero-Americano em Investigação Qualitativa*, 2016. *Investigação Qualitativa em Saúde /Investigación Cualitativa en Salud/ Volume 2*, pp: 1111-1120.
28. Beatty ME, Stone A, Fitzsimons DW, Hanna JN, Lam SK, Vong S, et al. Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Nov 16;4(11):e890. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000890>
29. Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço- De-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of chikungunya virus. *Virology*. 2014, Jun, 88 (11): 6294-306. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00370-14>
30. Andrade PP, Aragão FJL, Colli W, Dellagostin OA, Finardi-Filho F, Hirata MH, et al. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and

- assessment. Bull World Health Organ. 2016 Oct 1; 94(10): 766–771. Doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.173377>
31. Pacidônio EC, Caragata EP, Alves DM, Marques JT, Moreira LA. The impact of *Wolbachia* infection on the rate of vertical transmission of dengue virus in Brazilian *Aedes aegypti*. Parasit Vectors. 2017;10(1):296. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2236-z>
 32. Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. Rev Saude Publica. 2016;50(36):1-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006791>
 33. Kucharz EJ, Cebula-Byrska I. Chikungunya fever. Eur J Intern Med. 2012; 23(4):325–9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.01.009>
 34. Soumahoro MK, Boelle PY, Gaüzere BA, Atsou K, Pelat C, Lambert B, et al. The Chikungunya epidemic on La Réunion Island in 2005-2006: A cost-of-illness study. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(6): 9–12. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001197>
 35. Cardona-Ospina JA, Villamil-Gómez WE, Jimenez-Canizales CE, Castañeda-Hernández DM, Rodríguez-Morales AJ. Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Colombia, 2014. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2015 Dec;109(12):793-802. Doi: <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv094>
 36. Seyler T, Hutin Y, Ramanchandran V, Ramakrishnan R, Manickam P, Murhekar M. Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Andhra Pradesh, India, 2005-2006. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104(2):133–8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.014>
 37. Monitoramento dos casos de dengue, chikungunya e zika até a semana epidemiológica (SE) 44, 2017. Boletim Epidemiológico. Fortaleza, Ceará, nov. 2017. Available from: [boletim_arboviroses_se44_10_11_2017.pdf](#)

Box

38. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html (cited 2018 Jun 17).

39. Política Nacional de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_atencao_basica_2006.pdf (cited 2018 Jun 17).

SUPPLEMENTARY MATERIAL- QUESTIONNAIRE

[illegible]

Artigo 3- Resultados parciais em fase final de elaboração

Otimização da detecção Molecular de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em pool de larvas

Autores: Marília Andreza da Silva Ferreira, Marislane Carvalho Paz de Souza, Paulo Paes de Andrade, Éderson Akio Kido

Resumo:

Introdução: *Aedes aegypti* (L.) é um importante vetor de arbovírus e *Ae. albopictus* (Skuse) figura como vetor secundário no Brasil. A ecologia e a forma de controle das duas espécies são bastante diferentes. Hoje, o acompanhamento de distribuição e dispersão dos dois insetos é feito em grande parte com base no estudo das larvas, manualmente, com auxílio de lupas, o que demanda tempo e recursos humanos e financeiros. A introdução de metodologias para detectar rapidamente a presença das duas espécies em pool de larvas coletadas pelos sistemas de saúde pode ser um importante aliado no planejamento de ações efetivas de controle, especialmente em períodos de surtos e epidemias.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi otimizar um ensaio de PCR convencional que detecta *A. aegypti* e *A. albopictus* em pool de larvas em diferentes proporções de cada espécie, voltado para a realidade da Saúde Pública brasileira.

Métodos: Uma mistura de DNA de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em diferentes proporções foi utilizada para determinar a sensibilidade da PCR em amplificar e discriminar o DNA de cada espécie em pool de larvas. O DNA foi isolado através da técnica CTAB e a detecção foi feita por dois pares de primers projetados para ITS ribossômico

Resultados e Discussão: O limite inferior de detecção de DNA de qualquer uma das duas espécies foi 50 picogramas. O ensaio foi sensível e específico em misturas de ambas espécies em proporções de até 10.000 vezes. A presença de DNA de uma espécie não inibe a amplificação do alvo contido no DNA da outra.

Conclusões: O ensaio descrito é suficientemente sensível e específico para potencialmente detectar uma larva de uma espécie de *Aedes* em mistura com 10.000 larvas da outra espécie, o que permite reduzir muito o tempo, mão de obra e custos para alertar o sistema de saúde da presença de uma nova espécie numa área com presença bem estabelecida e disseminada da outra espécie vetora.

Palavras-chave: PCR, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, determinação da espécie, sensibilidade.

Introdução:

Os mosquitos do gênero *Aedes* são exóticos no Brasil. O *Aedes aegypti* transmite doenças humanas como dengue, febre amarela, zika e chikungunya e é essencialmente antropofílico. O *Aedes albopictus* apresenta competência vetorial para as mesmas doenças, sendo responsável por epidemias em outros locais, como

na Europa e Ásia, porém apresenta preferência por ambientes silvestres e menor antropofilia. O *Aedes aegypti* é o principal vetor no Brasil e o *Aedes albopictus* é um segundo vetor em importância epidemiológica. É importante identificar as espécies prevalentes num município em que ações de controle precisem ser executadas, pois as estratégias de controle são diferentes e direcionadas a bioecologia de cada inseto. O controle vetorial no Brasil é centrado no *Aedes aegypti* enquanto o *Aedes albopictus* é alvo de vigilância epidemiológica e entomológica, pois não é considerado como vetor das doenças circulantes no país (PANCETTI et al, 2015; WEERATUNGA, et al, 2017).

A identificação das larvas de *Aedes* no Brasil é realizada rotineiramente através de lupa estereoscópica, o que consome tempo e exige muita mão de obra especializada. Técnicas moleculares podem contribuir com celeridade no processo, pela velocidade de obtenção das respostas, possível pela utilização de uma abordagem massal para detecção da presença das duas espécies de insetos num mesmo pool. Ferramentas moleculares seriam úteis especialmente em surtos e períodos epidêmicos, em que é necessário saber rapidamente que espécie está envolvida na transmissão e manutenção das doenças, auxiliando assim no desenho de estratégias efetivas de controle.

Estudos moleculares que contribuem para esse propósito descrevem o uso de PCR convencional ou PCR em tempo real para a identificação de várias espécies do gênero *Aedes* (tabela 1), mas apenas KOTHERA, BYRD e SAVAGE (2017) avaliaram a questão da detecção de uma espécie vetora em mistura de grande desproporção com a outra espécie, o que é de especial interesse para a saúde pública. Entretanto, empregaram um PCR em tempo real, que não pode ser ainda aplicado de forma descentralizada no Brasil na vigilância entomológica. Utilizaram como amostra o sonicado de primeiro estágio larval e nesse trabalho foi utilizado o terceiro estágio larval.

Tabela 1: Estudos realizados para detecção molecular de espécies do gênero *Aedes*

Autores	Método de Extração	Técnica	Finalidade
BEEBE, 2007	Extração a partir de soluções	PCR, seguido de digestão com enzimas de restrição	Identificação molecular de espécies do gênero <i>Aedes</i>
COOK et al, 2005	Qiaquick Spin PCR purification kit (QIAGEN, Crawley, United Kingdom).	PCR, seguido de digestão com enzimas de restrição	Identificação molecular de culicídeos vetores (<i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> e <i>Culex</i>)
HILL et al, 2008	QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN,	PCR Real-Time	Identificação molecular de espécies do gênero <i>Aedes</i>

	Doncaster, VIC, Australia)		
HIGA et al, 2010	DNeasy Tissue kit (Qiagen)	PCR convencional	Deteccção e identificação molecular de cinco espécies de <i>Aedes</i>
CHAN et al, 2014	DNeasy Tissue kit (Qiagen)	DNA barcoding	Identificação molecular de culicídeos vetores (<i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Lutzomia</i> e <i>Culex</i>)
KOTHERA, BYRD e SAVAGE, 2017	Sonicação	PCR Real-Time	Identificação molecular de espécies do gênero <i>Aedes</i> e detecção da sensibilidade de detecção em misturas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>

Muitos dos autores citados empregaram kits para a extração do DNA. Embora essa opção reduza o trabalho de bancada e possa contribuir para a eficiência da extração, ela tem custos mais elevados que o uso de reagentes e não é adequada para uma técnica a ser implantada na vigilância em saúde do Brasil. De fato, o uso de kits cria a dependência de uma marca e encarece os custos e a troca de marca de um kit de extração implica na maior parte das vezes em troca de protocolo, o que termina sendo prejudicial para o serviço público em ações descentralizadas, que demandam capacitações de múltiplas equipes.

Objetivo: Este estudo tem como objetivo otimizar a técnica de PCR para detecção de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em pool de larvas contendo as duas espécies de modo a reduzir custos, mantendo a simplicidade operacional e obtendo uma elevada sensibilidade de detecção.

Métodos: Larvas de terceiro estágio das duas espécies foram obtidas de colônias do insetário da Fiocruz-Recife. As amostras foram armazenadas em álcool 70 % (v/v) e congeladas (-20°C). A extração de DNA de amostras contendo uma, 5 ou 10 larvas foi feita com base no protocolo proposto de Doyle e Doyle (1987), a partir do uso do detergente CTAB, com pequenas modificações (sem nitrogênio líquido e sem fenol). O DNA foi armazenado a - 20°C no laboratório de Genética Molecular da UFPE. Os DNAs foram analisados quanto a qualidade e quantidade, em gel de agarose 1% (p/v) e por espectrofotometria (NanoDrop®, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), respectivamente. As amplificações foram feitas de acordo com Higa et al. (2010): 1 ciclo a 96°C por 12 minutos, 40 ciclos a 96°C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos, 72 ° C por 90 segundos e 1 ciclo a 72°C por 4 min. Os pares de primers (HIGA et al., 2010) foram avaliados usando ferramentas de bioinformática [programa *PrimerBlast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primerblast.cgi>) e *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)] para verificar

especificidade e pareamento com sequências depositadas na base de dados NCBI. Para a síntese dos primers (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific.), a sequência do reverse primer de *Aedes albopictus* foi alterada, havendo uma troca na sétima base (G por A) e uma deleção no forward primer de *Aedes aegypti* na segunda base. Os primers usados para *Aedes aegypti* foram CCTTTGTACACACCGCCCG (forward), Tm de 61,32 e TAACGGACACCGTTCTAGGCCCT (reverse), Tm de 65,17 e com amplicon de 529 pares de bases e os primers usados para *Aedes albopictus* foram CCTTTGTACACACCGCCCG (forward), TM de 61,32 e G TACTAAGCTCACTGCCACTGA (reverses), com TM de 61,47 e gerando amplicons de 957 pb.

Misturas de DNAs provenientes de pools de larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (diferentes proporções na reação típica de 20 ng: 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000, tanto empregando *A. aegypti* como espécie majoritária como vice-versa) foram testadas quando à amplificação. Assim, as amostras de misturas foram amplificadas em triplicatas. Os produtos dos PCRs foram avaliados após corrida eletroforética em gel de agarose 1% (p/v), coloração com Blue-Green (LGC) e visualização em foto-documentador.

Resultados e Discussão:

a) Resultado das extrações com uma, 5 e 10 larvas das duas espécies. A Tabela 2 mostra a média das concentrações de DNA obtidas em 30 μ l de volume final de extração, para as duas espécies e para uma quantidade inicial de larvas variando de 1 – 10 unidades. O método utilizado para extração de DNA é simples e utiliza soluções comerciais, o que o torna mais barato do que os kits comerciais empregados em trabalhos similares a esse. O DNA resultante tem qualidade (valor medido da razão A260/A280 = 2,0) e quantidade suficientes para o ensaio proposto (Tabela 1).

Tabela 2: Médias das concentrações de DNA (ng/ μ l) obtido de larvas de Aedes (no mínimo três extrações), em volume final de 30 μ l

	1 larva	5 larvas	10 larvas
Aedes aegypti	203,4	629,3	742,53
Aedes albopictus	200,75	652,06	707,3

b) Resultados da sensibilidade dos dois ensaios

Para verificar o limiar de detecção (sensibilidade) do PCR para o DNA das duas espécies, amostras na concentração inicial de 500 ng/ μ l foram diluídas em quatro etapas de 10 X, alcançando um limite inferior de concentração de 0,05 ng/ μ l. Para todas as concentrações foi possível amplificar DNA a partir de 1 μ l de amostra diluída e visualizar em gel de agarose. Para a menor concentração, a quantidade de DNA amplificada corresponde a aproximadamente 1/4000 de uma larva de terceiro

instar. Os resultados para as duas espécies estão mostrados nas Figuras 1 e 2. Um estudo realizado com PCR Real-time chegou a níveis de detecção parecidos, em que o limite inferior foi 0,016 ng de DNA por reação de PCR (KOTHERA, BYRD e SAVAGE, 2017). Isso demonstra que a sensibilidade alcançada nesse ensaio com o DNA extraído sem kit e usando protocolos convencionais está otimizada em termos de sensibilidade.

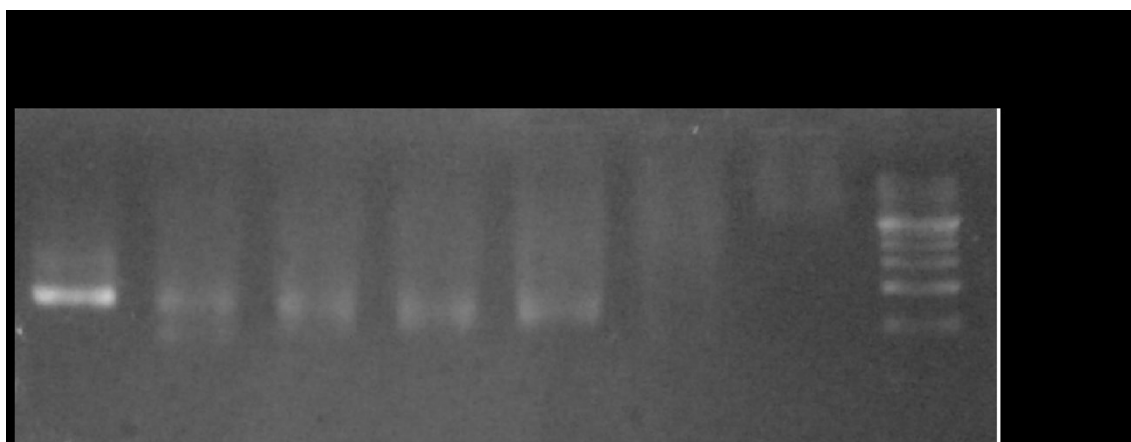


Figura 1: Teste de sensibilidade para a PCR otimizada para a partir de diluição seriada do DNA para *Aedes aegypti*. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando resultado da amplificação de DNA foi diluído a partir de 500 ng e incubado em reação de PCR de 20 ng. Foi utilizado o DNA marker (Ludwig-Biotec) de 1kb , representado a direita (0,5; 1; 2; 3 e 5 kpb). Neg: Controle negativo, sem DNA.

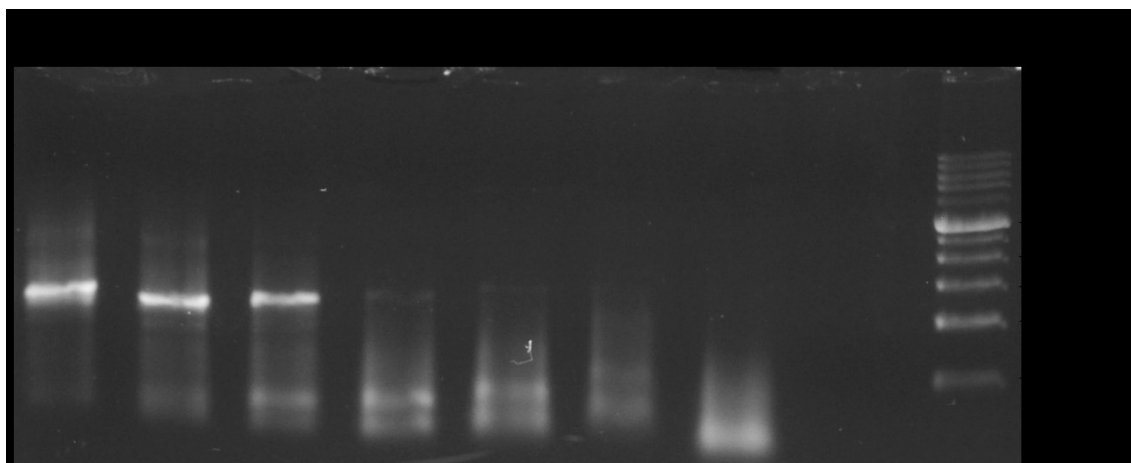


Figura 2: Teste de sensibilidade para a PCR otimizada para a partir de diluição seriada do DNA para *Aedes albopictus*. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando resultado da amplificação de DNA foi diluído a partir de 500 ng e incubado em reação de PCR de 20 ng. Foi utilizado o DNA marker (Ludwig-Biotec) de 1kb , representado a direita (0,5; 1; 2; 3 e 5 kpb). Neg: Controle negativo, sem DNA.

C) Resultados dos ensaios competitivos

Testes com misturas indicam que grandes diferenças nas concentrações iniciais não impedem a detecção de pequenas quantidades de DNA da espécie em menor concentração. Como exemplo, foi possível detectar cada espécie em diferença de 10.000 vezes (160 ng de *A. aegypti* para 0,016 ng de *A. albopictus* e vice-versa) (uma terceira figura será adicionada na versão final do manuscrito, mostrando os resultados dos ensaios de mistura comentados). Na prática, se houver uma larva de *A. albopictus*, o inseto menos distribuído no país, entre 10.000 larvas de *A. aegypti*, ainda assim a técnica permitiria sua detecção. Um estudo realizado com PCR Real-time encontrou resultados similares a estes, em que o ensaio foi sensível e específico em misturas de ambas as espécies, refletindo diferença de até 2.000 vezes na concentração de DNA (KOTHERA, BYRD, SAVAGE, 2017). O ensaio poderá ser mais rápido e eficiente se o governo disponibilizar kits Read to go® (água, Taq polimerase, tampão e primers) tornando a execução do ensaio mais adequada a qualquer instância do serviço público.

O ensaio consegue detectar até a quantidade de 0,5 ng em diluição seriada. Devido à sua elevada sensibilidade, nosso ensaio identifica larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* em pool, mesmo em proporções muito desiguais (1:10.000), o que o torna uma ferramenta útil para o serviço público de saúde, sobretudo numa perspectiva descentralizada de vigilância entomológica.

Referências

Beebe NW, Whelan PI, van den Hurk AF, Ritchie S a, Corcoran S, Cooper RD. A Polymerase Chain Reaction- Based Diagnostic to Identify Larvae and Eggs of Container Mosquito Species from the Australian Region. J Med Entomol. 2007; 44(2):376–80. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.2.376>

Cook S, Diallo M, Sall AA, Cooper A, Holmes EC. Mitochondrial Markers for Molecular Identification of *Aedes* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Involved in Transmission of Arboviral Disease in West Africa. J Med Entomol [Internet]. 2005; 42(1):19–28. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/42.1.19>

Chan A, Chiang LP, Hapuarachchi HC, Tan CH, Pang SC, Lee R, et al. DNA barcoding: Complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. Parasit Vectors. 2014; 7 (1):1–12.

Kothera L, Byrd B, Savage HM. Duplex Real-Time PCR Assay Distinguishes *Aedes aegypti* From *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) Using DNA From Sonicated First-Instar Larvae. J Med Entomol. 2017 Nov 7; 54(6):1567-1572. doi: 10.1093/jme/tjx125.

Hill LA, Davis JB, Hapgood G, Whelan PI, Smith GA, Ritchie SA, et al. Rapid identification of *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris*, and *Aedes aegypti* life stages using real-time polymerase chain reaction assays. Am J Trop Med Hyg. 2008 Dec; 79(6):866-75. Available from: <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/79/6/0790866.pdf?expires=153019>

2360&id=id&accname=quest&checksum=AF29DE352E5D7C7147292EC867E24EB
B

Higa Y, Toma T, Tsuda Y, Miyagi I. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Sep; 63(5):312-6. Available from: <https://www0.niid.go.jp/JJID/63/312.pdf>

Weeratunga P, Rodrigo C, Fernando SD, Rajapakse S. Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Protocol). *Cochrane Infectious Diseases Group*, Aug 2017. Doi: 10.1002/14651858.CD012759

Pancetti, FG., Honório, NA., Urbinatti, PR., Lima-Camara, TN. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2015, Jan-Feb, 48, (1): 87-89. Doi: 10.1590/0037-8682-0155-2014.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho foi elaborado na forma de quatro artigos, tendo como eixo principal a avaliação de ferramentas usadas no controle de *Aedes*. As seguintes conclusões foram obtidas:

- A armadilha construída com garrafa PET descartável de 2 l, denominada mosquitérica (ou mosquiteira) e disseminada por vários veículos de informação, inclusive pela Internet, para uso no combate intradomiciliar de *A. aegypti*, não reduz os níveis de infestação do vetor;
- Mesmo em período de epidemia de tríplice arbovirose, os órgãos de vigilância epidemiológica não foram capazes de detectar a incidência alarmante das doenças na região estudada, sendo a subnotificação uma realidade em Saúde pública, que deve ser esperada como deficiência operacional grave para todo o país;
- Novas tecnologias se impõem para que o controle do *A. aegypti* possa ser alcançado e o uso de variantes transgênicas do mosquito não deve ser descartada. Essas variantes podem seguir o padrão já bem estabelecido pelo uso de insetos estéreis, mas também pode lançar mão de formas mais eficientes de controle, como a supressão de populações pelo uso do gene drive (impulsor genético). Para isso o país possui um regulatório adequado e as ferramentas necessárias para a avaliação do risco de introdução das variantes geneticamente modificadas no ambiente.
- A chegada e permanência de um novo vetor, o *A. albopictus*, no país, precisam ser abordadas de forma eficiente pelos serviços de vigilância entomológica para que medidas proativas possam ser tomadas. A detecção da presença da nova espécie, mesmo em mistura de proporções muito desiguais com o vetor mais prevalente, o *A. aegypti*, pode ser vantajosamente feita pelo PCR convencional, empregando reagentes químicos de fácil acesso, como demonstrados aqui.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F., ZAMORA-PEREA, E., FERRAZ, G., PADILLA-TORRES, S. D., LUZ, S. L. B. Mosquito-Disseminated Pyriproxyfen Yields High Breeding-Site Coverage and Boosts Juvenile Mosquito Mortality at the Neighborhood Scale. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.4, e0003702, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003702>. Acesso em 05 de julho de 2018.
- ACIOLI, R. V. **O uso de armadilhas de oviposição (ovitrampas) como ferramenta para monitoramento populacional do Aedes spp em bairros do Recife. (Tese de Doutorado)**. Recife, Brasil: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; 2006. Disponível em: <http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2006acioli-rv.pdf> Acesso em 05 de julho de 2018.
- AKINER, M.M, DEMIRCI, B., BABUADZE, G., ROBERT, V., SCHAFFNER, F. Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V.10, n.4., 2016.
- ANDRADE, P.P., PARROTT. W., ROCA, M. M. **Guia para a Avaliação do Risco Ambiental de Organismos Geneticamente Modificados**. 1ª Edição, São Paulo, 2012.
- ANDRADE, P.P., ARAGÃO, F.J.L., COLLI, W., DELLAGOSTIN, O.A., FINARDI-FILHO, F., HIRATA, M.H., ET AL. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 10 p. 766–771, oct, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2471/BLT.16.1733777>
- BALDACCHINO, F., CAPUTO, B., CHANDRE, F., DRAGO, A. , DELLA TORRE, A. , MONTARSI, F., RIZZOLI, A. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, v. 71, p. 1471-1485, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.4044> Acesso em 05 de julho de 2018.
- BARRERA, R.; AMADOR, M.; ACEVEDO, V.; HEMME, R.R.; FÉLIX, G. Sustained, area-wide control of *Aedes aegypti* using CDC autocidal gravid ovitraps. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 1269–1276, 2014. Disponível em: 10.4269 / ajtmh.14-0426.
- BELLINI, R., BONILAUDI, P., PUGGIOLI, A., LELLI, D., GAIBANI, P., et al. (2016) Chikungunya and Dengue Risk Assessment in Greece. **Vector Biology Journal**.V.1, n. 2. doi:10.4172/2473-4810.1000108. 2016. Acesso em 05 de julho de 2018.
- BENCHIMOL, J. L. **Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2001. 470 pp.
- BESERRA, E. B., FERNANDES, C. R. M., SOUSA, J. T.; FREITAS, E. M.; KELIANA D SANTOS, K. D. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 1016-1023, dezembro de 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2010000600026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

BIOGENTS®. **Ciclo de vida do Aedes**. Disponível em: (<https://us.biogents.com/wp-content/uploads/life-cycle-Aedes-albopictus-asian-tiger-mosquito-en.jpg>). Acesso em 05 de julho de 2018.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 179-293, dez. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>. Acesso em 07 de setembro de 2017.

BRAGA, I.A., GOMES, A.C., NELSON, M., MELLO, R.C.G., BERGAMASCHI, D.P., SOUZA, J.M.P. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 347-353, 2000.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32, 2016**. Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 47, n. 33, 2016b.

BRASIL. LEI Nº 6.259, DE 30 DE OUTUBRO DE 1975. **Dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de coenças, e dá outras providências**. 1975. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/sileg/integras/227031.pdf>

BRASIL. LEI Nº 8.080, DE 19 DE SETEMBRO DE 1990. **Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências**. 1990. Acesso em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Entenda o caminho que um OGM percorre dentro da CTNBio**. 2018b. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/processo-de-ogm> Acesso em 05 de julho de 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **A CTNBio**. 2018a. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/a-ctnbio> Acesso em 05 de julho de 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Avaliação de armadilhas**. 2014a. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/poluicao/921-saude-de-a-a-z/dengue/13131-avaliacao-de-armadilhas> Acesso em 05 de julho de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. 160 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível

em: <http://www.saude.mppr.mp.br/arquivos/File/dengue/livroDiretrizes.pdf>. Acesso em: 21 de novembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA NO - 204, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2016. **Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências.** Brasília, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Levantamento Rápido de Índices para Aedes Aegypti (LIRAA) para vigilância entomológica do Aedes aegypti no Brasil : metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes.** Brasília : Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano de Contingência Nacional para Epidemias de Dengue.** Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano de Contingência Nacional para a Febre de Chikungunya** . Brasília : Ministério da Saúde, 2014b. 48 p. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/02/plano-contingencia-chikungunya-site-versao-2-30jan15.pdf> Acesso em 05 de julho de 2018.

BRASIL. PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 4, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017. **Consolidação das normas sobre os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde.** 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004_03_10_2017.html

BRASIL. Resolução nº 1 de 29/01/2008 / CNBS - Conselho Nacional de Biossegurança (D.O.U. 07/02/2008). **Aprova o Regimento Interno do Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS.**

BRASIL. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan: normas e rotinas.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_informacao_agrivos_notificacao_sinan.pdf [Cited 2018 Jun 17].

BRASIL. Vigilância Epidemiológica. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.** - 3. ed. - Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 84 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf. Acesso em 02 de outubro de 2016.

CABRAL, M., LIBERTO, M. **Armadilha letal para mosquitos, temperada com atitude de civilidade.** 2015. Disponível em: <http://www.faperj.br/downloads/mosquiterica.pdf>.

CALVET, G., AGUIAR, R.S., MELO, A.S.O., SAMPAIO, S.A., DE FILIPPIS, I., FABRI, A., et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n.6, p. 653-60, junho de 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)

CAPRARA, A., LIMA, J. W. O., MARINHO, A. C. P., CALVASINA, P. G., LANDIM, L. P., SOMMERFELD, J. Irregular water supply, household usage and dengue: a bio-social study in the Brazilian Northeast. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, s.1, p. 125-S136, Rio de Janeiro, 2009.

CAPRARA, A., LIMA, J. W. O., PEIXOTO, A. C. R., MOTTA, C. M.V., NOBRE, J. M. S., SOMMERFELD, J. Entomological impact and social participation in dengue control: a cluster randomized trial in Fortaleza, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, p. 99–105, 2015. Disponível em: [doi:10.1093/trstmh/tru187](https://doi.org/10.1093/trstmh/tru187). Acesso em 05 de julho de 2018.

CARAGATA, E. P. DUTRA, H. L. C., MOREIRA, L. A. Inhibition of Zika virus by Wolbachia in *Aedes aegypti*. **Microbial Cell**, V. 3, N. 7, July 2016. Disponível em: <http://microbialcell.com/wordpress/wp-content/uploads/2016/06/2016A-Caragata-Microbial-Cell.pdf>

CARVALHO, D. O., MCKEMEY, A. R., GARZIERA, L., LACROIX, R., DONNELLY, C. A., ALPHEY, L., et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, e0003864., 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003864>

CARVALHO, D. O., NIMMO, D., NAISH, N., MCKEMEY, A.R., GRAY, P., WILKE, A.B., et al. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, v.83, p. 3579, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063546/>

CAVALCANTI, L. P. G., PONTES, R. J. S.; ANA CLÁUDIA FERREIRA REGAZZI, A. C. F., et al. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.4, p.638-644, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006005000041> Acesso em 05 de julho de 2018.

CENTER FOR DISEASE CONTROL-CDC. **Biology and Control of *Aedes aegypti***. CDC, n. 4, Setembro de 1979.

CHAN A., CHIANG L.P, HAPUARACHCHI H. C, TAN C.H, PANG SC, LEE R., LEE K.S, NG L. C, LAM-PHUA S. G. DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. **Parasites & Vectors**, 2014. v. 12, n. 7, p. 569. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4282734/pdf/13071_2014_Article_569.pdf . Acesso em 18 de setembro de 2017.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 225pp. 1994.

CUGOLA, F.R., FERNANDES, I. R. RUSSO, F.B. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, p. 267–271, 09 June 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature18296.pdf>

DEGENER, C.M., ÁZARA, T.M.F., ROQUE, R.A., RÖSNER, S., ROCHA, E.S.O., KROON, E.G., et al. Mass trapping with mosquiTRAPs does not reduce *Aedes aegypti* abundance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.4, p.517–27, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140374> Acesso em 05 de julho de 2018.

DEPOLI, P.A.C., ZEQUI, J.A.C., NASCIMENTO, K.L.C, LOPES, J. Eficácia de Ovitrapas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*. **EntomoBrasilis**, v.9, n.1, pp. 51-54, 2016. Disponível em: doi:10.12741/ebrazilis.v9i1.509. Acesso em 02 de outubro de 2016.

DONALÍSIO, M.R., GLASSER, C.M. Entomological Surveillance and Control of Dengue Fever Vectors. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 5, n.3, 2002
DONATTI, J. E., GOMES, A. C. Adultrap: Descrição de armadilha para adulto de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, n. 2, p. 255-256, junho 2007.

DUTRA, H. L. C., ROCHA, M. N., DIAS, F. B. S., MANSUR, S. B. CARAGATA, E. P. MOREIRA, L. A. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n.6, p. 771–774, June 8, 2016. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906366/pdf/main.pdf>

EIRAS, E. A., BUHAGIAR, T.S., RITCHIE, S. A. Development of the Gravid *Aedes* Trap for the Capture of Adult Female Container–Exploiting Mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 200–209, January 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/ME13104>. Acesso em 05 de julho de 2018.
FAY R. W.; PERRY S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 25, p. 276-281, 1965.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, v. 2, 860 p. 2002.

FORATTINI, O.P. Identificação de *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* no Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, 1986,20: 244-5.

GAMA, RA., SILVA, E.M., SILVA, I.M., RESENDE, M.C., EIRAS, A.E. Evaluation of the sticky MosquiTRAP for detecting *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) during the dry season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p.294-302, 2007.

GÓIS, F. R. **INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (gênero Flavivírus) DE INTERESSE À SAÚDE PÚBLICA EM MOSQUITOS (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) EM FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ**. Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2017. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/47395/R%20-%20D%20-%20FERNANDO%20RODRIGUES%20GOIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

GOMES, A. C. Entomologic Surveillance. **Informe Epidemiológico do SUS**. V. 11. N.2. Pp.: 79 - 90.2002.

GOMES, A. C., SILVA, N. N., BERNAL, R. T. I., LEANDRO, A. S. Estimation of House Infestation by *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) Using Adultrap®. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 4, p. 293-300, Brasília, 2008.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 3, p.215–27, 2004.

GUEDES, D.R.D. **Epidemiologia molecular do *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)**. Dissertação apresentada ao Departamento de Saúde Coletiva, área de concentração em Controle de Endemias e Métodos de Diagnósticos. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; 2006.

GUO, C., ZHOU, Z., WEN, Z., LIU, Y., ZENG, C., XIAO, D., et al. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 12 July 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317> Acesso em 05 de julho de 2018.

HAMMOND, A., GALIZI, R., KYROU, K., SIMONI, A., SINISCALCHI, C., KATSANOS, D., et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. **Nature Biotechnology**, v. 34, n.1, p. 78-83, jan 2016. Disponível em: 10.1038/nbt.3439.

HASAN, S., JAMDAR, S.F., ALALOWI, M., BEAIJI, S.M.A.L.A. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v.6, n.1, p. 1-6, 2016. Disponível em: 10.4103/2231-0762.175416
http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/chemical_control/en/ Acesso em 05 de julho de 2018.

JOHNSON, B. J., RITCHIE, S. A., FONSECA, D. M., The State of the Art of Lethal OvipositionTrap-Based Mass Interventions for Arboviral Control. **Insects**, v.8, n.5; 2017. Disponível em: doi:10.3390/insects8010005. Acesso em 03 de março de 2017.

KAY, B. H., CARLEY, J. G. Transovarial transmission of Murray Valley encephalitis virus by *Aedes aegypti* (L). **NATURE**, v.58, n.5, p.501-4, oct.1980.

KRAEMER, M.U. G., SINKA, M. E., DUDA, K. A. , MYLNE, A. Q. N., SHEARER, F. M., BARKER, C. M, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes*

aegypti and *Ae. Albopictus*. **ELife**, V. 4, e08347, 2015. Disponível em: 10.7554/eLife.08347

KRÖCKEL, U., ROS, A., EIRAS, A.E., GEIER, M. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 229–238, 2006.

KUCHARZ, E. J., CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 325-9, 2012.

LACON, G., MORRISON, A.C., ASTETE, H., STODDARD, S.T., PAZ-SOLDAN, V.A., et al. Shifting Patterns of *Aedes aegypti* Fine Scale Spatial Clustering in Iquitos, Peru. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, e3038. Disponível em: doi:10.1371/journal.pntd.0003038. Acesso em 05 de julho de 2018.

LEES, R. S., GILLES, J. R.L., HENDRICH, J., VREYSEN, M. J. B., BOURTZIS, K. Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 156-162, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.011>.

LI, C.X., GUO, X.X., DENG, Y.Q., et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. **Emerging Microbes & Infection**, v. 6, n.4. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28442754> Acesso em 05 de julho de 2018.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 2016. 501-7. Disponível em: <http://4www.redalyc.org/articulo.oa?id=67247719055>. Acesso em: 11 de agosto de 2017.

LIMA-CAMARA, T. N., HONÓRIO, N. A., LOURENÇO-OLIVEIRA, R. Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 10, p. 2079-2084, Rio de Janeiro, out, 2006

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 55-64, setembro de 2014. Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 19 julho de 2017.

MACIEL-DE-FREITAS R., EIRAS A.E., LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 321–325, 2006.

MACKAY, A. J., AMADOR, M., BARRERA, R. An improved autocidal gravid ovitrap for the control and surveillance of *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, v. 6, n.225,

2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-225> Acesso em 05 de julho de 2018.

MANDYATA, C.B., OLOWSKI, L. K., MUTALE, W. Challenges of implementing the integrated disease surveillance and response strategy in Zambia: A health worker perspective. **BMC Public Health**, v. 17, n.1, p. 1–12, 2017. Disponível em: 10.1016/j.ejim.2012.01.009 Acesso em 05 de julho de 2018.

MARTI, G. A., MICIELI, M. V., SCORSETTI, A. C., LILJESTHRÖM, G. Evaluation of *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopoidea) as a Control Agent of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 535-540, Aug. 2004.

MITCHELL, C. J.; FORATTINI, O. P.; MILLER, B. R. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 171-177, June 1986 . Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101986000300001>. Acesso em 11 de agosto de 2017.

MORAES, L. M. P.; BALDI, A. M.; CASTRO JR., A. A. **Sistema Web de Geolocalização para Auxílio no Combate à Infestação de Doenças**. In: Encontro Nacional de Grupos PET, 2015, Belém - PA. Anais do XX ENAPET, 2015.

MULHERN, T. D. New Jersey mechanical trap for mosquito surveys. (reprint from 1942). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 4, p. 411–418, 1985.

NAM, V. S. YEN, N. T., PHONG, T. V., NINH, T. U., MAI, L. Q., LO, L. V., et al. Elimination of Dengue by community programs using *Mesocyclops* (Copepoda) against *Aedes aegypti* in central Vietnam. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 67 – 73, Jan 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.67> Acesso em 18 de setembro de 2017.

NELSON, M. J. ***Aedes aegypti: biology and ecology***. Washington; PAHO; 1986. 50 p.

NIYAS, K.P., ABRAHAM, R., UNNIKRISHNAN, R.N., MATHEW, T., NAIR, S., MANAKKADAN, A., ISSAC, A., SREEKUMAR, E. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. **Virology Journal**, v. 13, n.7 p. 1-8, 2010. Disponível em: 10.1186/1743-422X-7-189. Acesso em 05 de julho de 2018.

O'NEILL, S. L. The Use of Wolbachia by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses . **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 1062:355-360, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_24

OBENAUER, P.J., KAUFMAN, P.E., KLINE, D.L., ALLAN, S.A. Detection of and monitoring for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in suburban and sylvatic habitats

in north central Florida using four sampling techniques. **Environmental Entomology**, v. 39, n. 5, p. 1608-1616, 2010. Disponível em: doi: 10.1603/EN09322. Acesso em 05 de julho de 2018.

OCAMPO, C.B., GONZÁLEZ, C., MORALES, C.A., PÉREZ, M., WESSON, D., APPERSON, C.S. Evaluation of community-based strategies for *Aedes aegypti* control inside houses. **Biomedica** [Internet], v.29, n. 2, p. 282–97, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128353> Acesso em 05 de julho de 2018.

OECD. **Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 8: OECD Consensus Document of the Biology of Mosquito *Aedes aegypti***, Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. OECD Publishing, v.8, Paris, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264302235-en>. Acesso em 05 de julho de 2018.

PAMPLONA, L. G. C., LIMA, J. W. O., CUNHA, J. C. L., SANTANA, E. W. P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de cimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n. 5, p. 400-404, set-out, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/readcube/epdf.php?doi=10.1590/S0037-86822004000500006&pid=S0037-86822004000500006&pdf_path=rsbmt/v37n5/21339.pdf&lang=pt Acesso em 05 de julho de 2018.

PANCETTI, F.G., HONÓRIO, N.A., URBINATTI, P.R., LIMA-CAMARA, T.N. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.1, p. 87-89, Jan-Feb, 2015. Disponível em: 10.1590/0037-8682-0155-2014.

PAREDES-ESQUIVEL, C., LENHART, A., DEL RÍO, R., LEZA, M.M., ESTRUGO, M., CHALCO, E., CASANOVA, W., MIRANDA, M.Á. The impact of indoor residual spraying of deltamethrin on dengue vector populations in the Peruvian Amazon. **Acta Tropica**, v. 154, p. 139-144, 2016. Disponível em: 10.1016/j.actatropica.2015.10.020.

PERICH, M. J., KARDEC, A. , BRAGA, I. A., PORTAL, I. F., BURGE, R. , ZEICHNER, B. C., BROGDON, W. A. AND WIRTZ, R. A. Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vectors in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17: p.205-210, 2003. Disponível em:10.1046/j.1365-2915.2003.00427.x. Acesso em 05 de julho de 2018.

PLOURDE, A. R., BLOCH. E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n.7, July 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.151990>

POLANCZYK R. A., GARCIA M. O., ALVES, S. B. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**

[Internet], v. 37, n. 6, p.813–6, 2003. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14666315> Acesso em 05 de julho de 2018.

PRESTI, A. L., LAI, A., CELLA, E., ZEHENDER, G., CICCOCCHI, M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925-932, 2014. Disponível em: 10.1016/S1995-7645(14)60164-4.

PRIDGEON, J.W., ZHAO, L., BECNEL, J.J., STRICKMAN, D.A., CLARK, G.G., LINTHICUM, K.J. Topically applied AaELAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n.3, p. 414-20, may, 2008.

RANDOLPH, V. B., HARDY, J. L. Establishment and Characterization of St Louis Encephalitis Virus Persistent Infections in *Aedes and Culex* Mosquito Cell Lines. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 2189-2198, 1988.

RAPLEY, L. P., JOHNSON, P. H. , WILLIAMS, C. R. A lethal ovitrap-based mass trapping scheme for dengue control in Australia: II. Impact on populations of the mosquito *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, n.4, p. 303-316, December, 2009.

REGIS, L.; MONTEIRO, A. M.; SANTOS, M. A. V. M.; SILVEIRA JR, J. C.; FURTADO, A. F.; ACIOLI, R. V.; SANTOS, G. M.; NAKAZAWA, M. ; CARVALHO, M. S. ; RIBEIRO JR, P. J. ; SOUZA, W. . Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 50-59, 2008.

REGIS, L. N., ACIOLI, R. V., SILVEIRA, J. C JR., MELO-SANTOS, M.A.V., SOUZA, W. V., RIBEIRO, C.M.N., et al. Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities. **PLoS ONE**, v.8, n.7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067682> Acesso em 02 de fevereiro de 2017.

REITER, P. Oviposition and dispersion of *Aedes aegypti* in an urban environment. **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique**. V. 89, N.2, P. 120-122, 1996.
 RESENDE, M. C., SILVA, I. M., EIRAS, A. E. Operational Evaluation of a Sticky Trap in the Monitoring of *Aedes aegypti*. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 4, p. 329-338, out-dez 2010. Disponível em:
<http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v19n4/v19n4a03.pdf> Acesso em 05 de julho de 2018.

RESENDE, M. C., SILVA, I. M., ELLIS, B. R., EIRAS, A. E. A comparison of larval, ovitrap and MosquiTRAP surveillance for *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n. 8, p. 1024-1030, dez. 2013. Disponível em: 10.1590/0074-0276130128

ROBERTS, A., ANDRADE, P.P., OKUMU, F., QUEMADA, H., SAVADOGO, M., SINGH, J.A., JAMES, S. Results from the Workshop "Problem Formulation for the Use of Gene Drive in Mosquitoes". **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 530-533, 2017. Disponível em: 10.4269/ajtmh.16-0726.

ROSEN, L., TESH, R.B., LIEN, J.C., CROSS, J.H. Transovarial transmission of *Japanese encephalitis* virus by mosquitoes. **Science**, v.199, n. 4331, p. 909-11, 24 de fevereiro de 1978.

RÿCKERT, C., WEGER-LUCARELLI, J., GARCIA-LUNA, J. S. M., YOUNG, M. C., BYAS, A. D., MURRIETA, R. A., FAUVER, J. R., EBEL, G. D. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**, 19 may, 2017, v. 8, n. 15. S.412. Disponível: DOI: 10.1038/ncomms15412, 2017. Acesso em 05 de julho de 2018.

SANTOS, E.M.M, MELO-SANTOS, M.A.V., OLIVEIRA, C.M.F, CORREIA, J.C., ALBUQUERQUE, C.M.R. Evaluation of a sticky trap (AedesTraP), made from disposable plastic bottles, as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations. **Parasites & Vectors**, v.5, n. 195, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-195> Acesso em 05 de julho de 2018.

SATOTO, T.B.T, LISTYANTANTO, A., AGUSTJAHJANI, S.D., et al. Vertical transmission of dengue virus in the Yogyakarta airport area. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v.23, n. 22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0711-6> Acesso em 05 de julho de 2018.

SETHA. T, CHANTHA N., BENJAMIN. S., SOCHEAT, D. Bacterial Larvicide, *Bacillus thuringiensis israelensis* Strain AM 65-52 Water Dispersible Granule Formulation Impacts Both Dengue Vector, *Aedes aegypti* (L.) Population Density and Disease Transmission in Cambodia. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 10(9): e0004973, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004973> Acesso em 05 de julho de 2017.

SINGH, A. D., WONG, S., RYAN, C.P., WHYARD, S. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. **Journal of Insect Science** [Internet], v. 13, n. 1, p.69, 2013. Disponível em: [//insectscience.oxfordjournals.org/content/13/1/69.abstract](http://insectscience.oxfordjournals.org/content/13/1/69.abstract) Acesso em 05 de julho de 2018.

SITHIPRASASNA, R., MAHAPIBUL, P., NOIGAMOL, C., PERICH, M. J., ZEICHNER, B. C., BURGE, B., et al. Field evaluation of a lethal ovitrap for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n.4, p. 455-62, julho de 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.455> Acesso em 05 de julho de 2018.

SOUZA, L. J. et al. Estratégias técnicas e operacionais para o controle do *Aedes aegypti*. In: _____; AZEVEDO, J. **Dengue, zica e chikungunya: diagnóstico, tratamento e prevenção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. p. 129-142.

STAPLES, J. E., BREIMAN, R. F., POWERS, A. M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n.6, p. 942–948, 15 September 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/605496>

SUDIA, W. D., CHAMBERLAIN, R. W. Battery-operated light trap, an improved model. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 4, n. 4, p. 536-538, dec. 1988. Disponível em: https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V04_N4_P536-538.pdf Acesso em 05 de julho de 2018.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 18, n.3., p. 867-71. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2002000300030> Acesso em 05 de julho de 2018.

VALLE, D.; BELLINATO, T. A.; MARTINS, A. J. **Controle químico de *Aedes aegypti* resistência a inseticidas e alternativas**. In: VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2015.

VILLAMIL-GÓMEZ, W. E., GONZÁLEZ-CAMARGO, O., RODRIGUEZ-AYUBI, J., ZAPATA-SERPA, D., RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. **Journal of Infection and Public Health**, v.9, n. 5, p. 684–686, September–October, 2016.

WALDEZ, F., CAMPOS, M.P. C., LOPES, N. O., PEREIRA, R. A. R. Armadilha da mosquitêrica: atividade do PIBID no combate ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista de educação, ciência e tecnologia do IFAM**, v. 8, n. 2, dezembro de 2014. Disponível em: <http://200.129.168.183/ojs/index.php/igapo/article/view/269/257> Acesso em 18 de setembro de 2017.

WALKER, T., JOHNSON, P.H., MOREIRA, L. A., ITURBE-ORMAETXE, I., FRENTIU, F.D., MCMENIMAN, C.J., et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450–3, 2011.

WHO, **Integrated Vector Management (IVM)**. 2018a. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/ivm_concept/en/ Acesso em 05 de julho de 2018.

WHO. **Chemical control**. 2018b. Disponível em:

WHO. **Mosquito larvae**. 2017. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/en/ Acesso em 05 de julho de 2018.

WILLIAMS, C.R., LONG, S.A., WEBB, C.E., BITZHENNER, M., GEIER, M., RUSSELL, R.C., RITCHIE, S.A. *Aedes aegypti* population sampling using BG-Sentinel traps in north Queensland Australia: statistical considerations for trap deployment and sampling strategy. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n.22, p. 345-350, 2007.

ZANLUCA, C., MELO, V. C. A., MOSIMANM, A. L. P, SANTOS, G. I. V., SANTOS, C. N. D., LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [periódico na internet], v. 4, n. 4, 2015.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v110n4/0074-0276-mioc-0074-02760150192.pdf>. Acesso em 05 de setembro de 2016.

ZARA A. L. S. A., SANTOS S. M., FERNANDES-OLIVEIRA E. S., CARVALHO R.G., COELHO G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão.

Epidemiologia e Serviços de Saúde, v.25, n.2, p.391-404, abr-jun 2016. Disponível em: 10.5123/S1679-49742016000200391 Acesso em 05 de julho de 2018.

ZYTOON, E.M., EL-BELBASI, H.I., MATSUMURA, T. Transovarial transmission of chikungunya virus by *Aedes albopictus* mosquitoes ingesting microfilariae of *Dirofilaria immitis* under laboratory conditions. **Microbiology and Immunology**, v.37, n.5, p. 419-21, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394983>. Acesso em 05 de julho de 2018.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BMC PROCEEDINGS***GM insect pests under the Brazilian regulatory framework: development and perspectives***

Andrade PP¹, Ferreira MAS², Muniz MS¹ and Lira-Neto, AC³,
¹Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de
Campina Grande, PATOS, PB, Brazil; ² Departamento de Genética,
Universidade Federal de Pernambuco, RECIFE, PE, Brazil; ³ Instituto
Agrônômico de Pernambuco -IPA, RECIFE, PE, Brazil

Abstract:

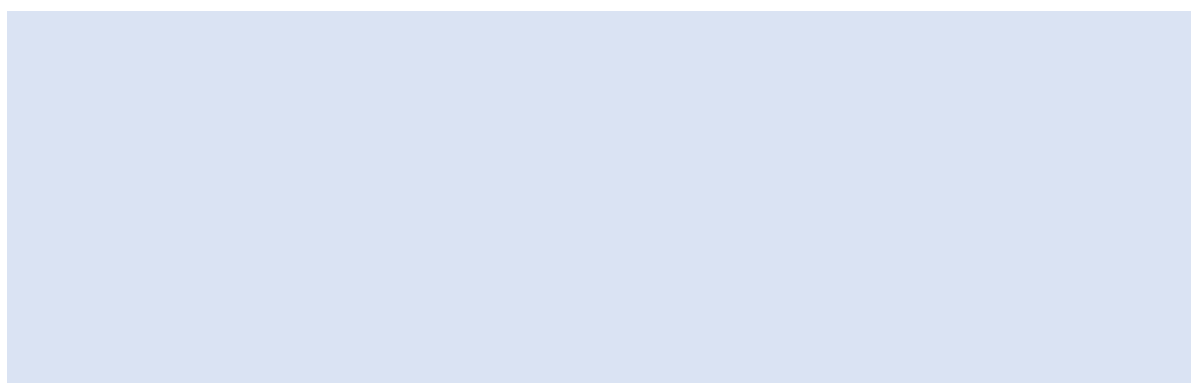
The emergence of new technologies for genetic modification has broadened the range of possible new products. The regulations of many countries that could benefit from these new products may not be prepared to assess risks and enable science-based decision-making. This is especially acute in the case of genetically modified insects with potential use in public health and agriculture. Modifications of the regulatory framework, sometimes necessary to allow a proper risk assessment of products from new technologies, are strongly influenced by political decisions derived from the balance of power and interest among stakeholders. This article discusses the Brazilian regulatory framework, its applicability for the risk assessment of genetically modified insects and the scenarios that have shaped the two biosafety laws that established the basis for the use of modern biotechnology in the country. It is concluded that, for the adoption of the new technologies, it is important to carefully navigate the political tensions by seeking the engagement and empowerment of stakeholders supporting science-based decision-making in order to gather the necessary support for adoption of new technologies.

1. The structure and function of the Brazilian National Biosafety System

Like many other countries, Brazil has adopted a technology-based approach to regulate GMOs [1]. In 1995, the first Biosafety Law created a centralized agency – the National Biosafety Technical Committee (CTNBio) - to assess GMO risks and to decide on a scientific basis if a GMO can be used in field (containment) experiments or commercially released. CTNBio also issues certificates on biosafety, essential to perform any activity related to GMOs in public and private institutions. Due to many

conflicts with the existing legal framework, the law was considered inadequate and was substituted in 2005 by Law 11105/2005 (<http://bch.biodiv.org/database/attachedfile.aspx?id=1601>), which removed the conflicts and empowered CTNBio as the central body for biosafety regulation. Its main responsibilities are outlined in Box 1 below.

Box 1. Main responsibilities and functions of the National Biosafety Technical Committee (CTNBio):



CTNBio is an entity composed of representatives from all five relevant ministries (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1995/D1520.htm) and its decisions, primarily based on risk assessment, cannot be overturned by any other instance or legislative body except the National Biosafety Council (CNBS), composed of 11 State Ministers. Even this Council may only argue based on social or economic issues directly linked to the intended commercial use of the new GM product. However, if new hazards or damages are identified by any third party, they can be reported to CTNBio, which must reassess the product and, if non-negligible risks are identified, act accordingly.

Both the Council (CNBS) and the Committee (CTNBio) integrate a network including regulation/enforcement agencies and local institutional Internal Biosafety Committees – CIBio (Fig. 1). Moreover, as a Party to the Cartagena Protocol on

Biosafety, Brazil has also to comply with a set of specific requirements on transboundary GMO movement.

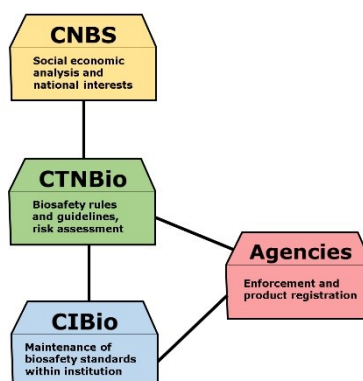


Figure 01: Relations between the main components involved in the Brazilian regulatory system. The whole system is based on the decisions of CTNBio, a technical-scientific body. The Commission assesses risks associated to GMO, authorizes field trials and, at the end of the process, may grant permission for its commercialization. Only biosafety and science-based issues are taken into account in the risk assessment that supports the technical recommendation. In turn, the CNBS, which is hierarchically superior, has the power to veto the marketing of genetically modified products based on social or economic considerations. Only in extraordinary cases, CNBS may analyze risks of products authorized for commercial release by CTNBio. CIBios are commissions within institutions / companies working with GMOs and are directly subordinated to CTNBio that grants them a certificate of biosafety-CQB, which is a license given by CTNBio to the requesting institution to carry activities involving GMOs and their derivatives. Communication must be constant between them. Another important player is the set of agencies responsible for Registration and Inspection/Enforcement (ANVISA – the National Health Surveillance Agency, IBAMA - Brazilian Institute of Environment and MAPA – Ministry of Agriculture, Livestock and Supply). They inspect GMO field releases and register products once the commercial release is granted by CTNBio.

2. A brief history of the stakeholder scenarios before and after the enactments of the first and second Biosafety Laws

Brazil was one of the first countries to embrace agricultural biotechnology. Following a then prevailing international trend of regulating the technology, instead of the product, the country produced in 1995 a new specific law on the use of transgenic organisms and adapted the existing legal framework to assess GMO risks and to pave the road to the adoption of agricultural biotechnology.

Regulators and scientists then faced a difficult task of weaving the first GMO regulatory framework in a complex scenario, with very vocal stakeholders against

biotechnology, a populist government and a general lack of experience in dealing with GMOs. The Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA, a state-owned research corporation, and other Brazilian private or public companies, as well as the transnational biotech giants, were actively engaged in the development of the new law, but resistance from international environmental NGOs and social movements connected to landless “campesinos” and other opponents were able to weaken the law, which then produced only a slight change in the existing laws as to not conflict with the Biotechnology law issued 1995 (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8974.htm). This, in turn, created conflicts of authority [2], mainly between the Institute of Environment and Natural Resources (IBAMA), an uncompromising defender of the environment and clearly against GMOs, and the National Biosafety Committee (CTNBio), in charge of GMO risk assessment, but accused of having excessive links with the private sector and not having independence in their risk assessment.

By exploring the existing legal conflicts in the regulatory framework, the GMO opposition was able to halt the release of the sole GMO approved for commercial release by CTNBio in 1998, a genetically modified soybean variety, and establish a *de facto* moratorium, disqualifying CTNBio's decisions and requiring an overly complex and onerous process for the approval of commercial releases of new GMOs [3,4].

A new strong stakeholder was decisive in reversing the moratorium: the soybean growers of Southern Brazil. As depicted in the stakeholder maps from Figure 2, the Soybean Associations already had some relevance in the scenario prior to the enactment of the first Biosafety Law due to the fast development of the soybean sector in Brazil in the 90's. In neighboring Argentina, growers were

experiencing increased profit due to the early adoption of transgenic soybeans and the Brazilian soybean farmers were falling behind and losing competitiveness. As a legal reversal of the moratorium was very unlikely, a large group of growers decided to smuggle seeds from Argentina, which has a very similar climate and soil characteristics. The illegal planting probably started as early as 1999 and in the 2003 harvest there were already more than 10 million tons of transgenic soybeans in the silos [5]. In the meantime, there was a growing consensus among a large group of stakeholders that the confused legal framework was causing enormous scientific and technological damage to the country, as well as leading to significant losses of economic opportunities in the field of biotechnology, both agricultural and industrial [2].

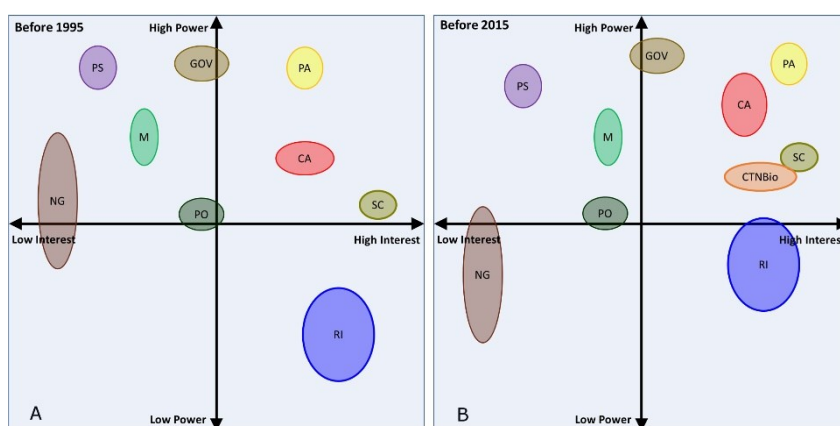


Figure 02: Maps showing the positioning of the main stakeholders that influenced the process of construction of the biotechnology laws implemented in Brazil in 1995 and, subsequently, in 2005. The x and y axes represent the level of interest and power of influence, respectively, in shaping the Brazilian regulatory framework. Figure A depicts the scenario of the discussions that preceded the creation of Law 8.974 / 1995 and figure B the positioning of the different stakeholders in shaping the present law 11.105 / 2005. Comparing these two scenarios, it is worth noting the increase in the power of influence of the agribusiness sector and of research institutions, together with the increase of interest of the Brazilian government and agribusiness politicians. This was mainly due to the clamor of large commodity planters, such as soybeans, who saw neighboring countries like Argentina increase their productivity using herbicide-resistant GMO seeds. In this context, groups opposed to the adoption of this technology, such as NGOs and politicians linked to social movements, who had a significant influence on decision making in scenario A, lost strength in scenario B and influenced

media to a lesser extent. Both the public and the media began to perceive the benefits of technology for an agricultural country like Brazil, as well as the hypothetical risks. However, public opinion proved to be more resistant to a significant change, possibly as a consequence of the intense NGOs and social movements influence during the shaping of the first law. CTNBio appears only at moment B because it was created precisely with the law 8.974 / 1995. **Seed companies (SC); Research institutes (RI); Politicians aligned to agribusiness (PA); Politicians aligned to social movements (PS); Public opinion (PO); Commodity agroindustry (CA); Government (GOV); Media (M); NGOs and Social Movements (NG); National Biosafety Technical Committee (CTNBio).**

By 2004, the legal conflicts in the regulatory framework were considered to be unsurmountable [4]. On the other hand, the Federal Government had to deal with the illegal soybean harvests and the country's debut as Party to the Cartagena Protocol, which opened for signature in 2000. Brazil ratified the Protocol late in 2003, which came into force in February 2004 (<https://bch.cbd.int/about/countryprofile.shtml?country=br>). The progressively larger adoption of GM plants, the lack of any evidence of negative environmental impact or health damage due to the planting and consumption of GM plants and a wider and more influential participation of the scientific society in the debates around GMOs and stem cells [6] contributed to a relative power reduction among opposition stakeholders. The changing scenario prompted the Brazilian Government in 2005 to issue the new Biosafety Law that is now in force, and to rewrite or revoke all other conflicting laws and decrees as to solve the previous legal imbroglio. Under the new law, CTNBio has essentially the same duties, but has more power, because its decisions are sovereign and legally binding.

The adoption of both agro- and industrial biotechnology has progressed immensely ever since in Brazil, with the adoption of GM products for many different applications, such as cellulose production, second-generation ethanolic fermentation, vaccines, diagnostics and recently, vector control. Indeed, the transgenic OX513A

Aedes aegypti was considered safe by CTNBio in 2014 [7] and is currently under efficiency assessment in the State of São Paulo.

3. Transgenic insects under the Brazilian regulatory framework

The step-by-step approach to GMO risk assessment was developed in the last 20 years, building on the experience of many specialists, and is largely accepted [8,9,10]. The five steps of a complete environmental risk assessment followed at CTNBio encompass a large set of information needed to establish the context in which the GMO will be used, either in containment, confinement or in large scale, unconfined releases. They also establish the procedures to classify the probabilities of a hazard to materialize into harm and how to classify the extent of the consequences (or harm). Finally, the approach also allows a logical and systematic use of likelihoods of exposure to the GMO and harm extension to assess risks for each conceivable or perceived hazard (Fig.3).



Figure 03: Diagram presenting the methodology of risk assessment of GMOs, with its five stages. Ellipses on the left represent the information needed to define the context where the GMO will be used.

Although transgenic plants were the main subjects of the first risk assessments, animals, bacteria, protozoa, fungi and viruses were also regarded as

potential organisms to be assessed, and this allowed the accommodation of specific questions relative to different taxa in the broad risk assessment procedure. In the Brazilian regulatory framework, Normative Resolution nr. 5 (<http://ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas>) regulates the unconfined commercial release of GMOs and is structured as a primary general part, followed by a set of annexes with specific questions needed to assess food and feed safety (Annex III) and environmental risks (Annex IV). This last annex has specific questions aimed towards organisms used for biological control (item E) and invertebrates (item I). The use of question lists, while providing some legal certainty to the applicant and helping in the identification of possible hazards, rigidifies the risk assessment. Aware of this limitation, CTNBio exercises its right to add appropriate questions for each new risk assessment and, likewise, exempts the applicant from responding to questions that do not apply to the GMO being evaluated.

When assessing OX513A *Aedes aegypti* risks in confined trials back in 2011, CTNBio had to deal with an important new question, i.e., the dispersal of released male mosquitoes out of the experimental area. Although GM plants can also disperse in the environment, regular control measures can effectively confine the plants to the experimental area, but there was no immediate, obvious way of controlling mosquito dispersal. Both normative resolutions (NRs. 6 and 8) regulating confined releases were of little help with this concern. However, as the genetic construct inserted in this GM mosquito determines its death and that of its offspring, the commission considered the dispersion to be very limited due to the short life span of the insects. Although a few insects escape the lethal mechanism in the first generation, they are very unlikely to do so in the next generation and the chances of dispersion are very low, even in the absence of any physical barrier. A similar

approach may be used to any self-limiting GM insect, both for vector or for pest control.

Specific questions from Annex IV were of some help to derive possible hazards associated with the transgenic *Aedes* in the unconfined release risk assessment phase, but most plausible hazards came from the regular assessment of the context, as determined by the application of the same risk assessment guidelines used for other GMOs. Similarly, plausible hazards from other GM insects will possibly derive in a straightforward way from the application of the regular risk assessment guidelines.

As with the discussion surrounding the approval of planned releases and the commercial release of the GM *Aedes*, it is likely that non-biosecurity issues will be brought to the forefront by stakeholders opposed to other GM insects. This is a common strategy in many fora and a well-delineated regulatory framework can avoid mixing issues relevant to risk assessment with those important in other contexts (economic, social, etc.). Brazilian legislation requires that the risk assessment of GMOs be the exclusive attribution of CTNBio, while economic and social issues must be addressed by the various ministries that will register and supervise the use of the new product or by the National Biosafety Council (CNBS). This strategic separation prevents CTNBio from having to discuss and take into account aspects that are not directly related to biosafety in its technical decision. On the other hand, the separation leaves the market, the regulatory agencies or the CNBS with economic, social, political or religious decisions.

Transparency and other issues of risk communication must be thoroughly assessed and the success of a commercial application for a new GM insect will strongly depend on how the different stakeholders will access the information.

Reeves, et. al. [11] suggest a checklist for assessing the scientific quality of approvals for un-caged field trials that may guide the risk analyst to help risk assessors and delineate an adequate strategy to overcome public mistrust and opposition, both in field trials and in commercial releases. The list, however, suggests the requirement to provide biological materials to independent investigators and some other measures that can hinder a final assessment, instead of producing a more transparent technical opinion.

Moreover, the technology developer must act accordingly and should bring to the public the largest possible set of useful information in accessible language to gather the public cooperation and reduce mistrust. This was effectively done in Brazil during the GM *A. aegypti* field releases back in 2011-2012 and is currently unfolding as a successful strategy in the mass releases for *A. aegypti* control in Piracicaba, Brazil [12].

4. Gene drives for the control of insect populations under the Brazilian GMO regulatory framework and the new breeding technologies (NBTs)

The recent discovery of new ways to efficiently edit genomes of many organisms, including insects, coupled with the insertion of gene drives in the newly edited genomes, opened a whole new field of applications for both genome editing and gene drives [13,14,15]. Vector and pest control is certainly one of the most appealing applications of gene drives, both for population reduction (or eradication) and population control [16,13,17,18,19].

Gene drives, however, are such powerful tools that they immediately raised concerns among a wide range of stakeholders, including scientists, activists, politicians and health managers [19,20,21]. The public perception is relatively polarized against the use of gene drives in many countries and even among

scientists the opinions vary widely. Once again opposition to GMOs has taken the lead in this debate on many forums, leading to a collective fear that can be reversed as knowledge about technology becomes more comprehensive and available.

For risk assessors, however, gene drives can be considered as genes having an increased non-Mendelian transmission rate, usually approaching 100%. All other aspects are similar to regular genes. Indeed, using the regular approach for GMO risk assessment commented above, a group of scientists and regulators came recently to the conclusion that gene drives for population substitution or population reduction, when applied to *Anopheles gambiae* in an African environment, do not pose important risks either to the environment or to human health [21]. A similar assessment may be made by CTNBio in the near future for gene drive insects, as its normatives and procedures are in close agreement with those of other official regulatory agencies and with international organizations, as the Center for Environment Risk Assessment.

The 2005 Brazilian Biosafety law defines what is a GMO. As many other former legislations, the Brazilian law and its decree regulate genetic engineering (GE) products, which should contain a transgenic DNA either in its genome or in extrachromosomal plasmid or in an organelle. Although the GE definition is rather ample, encompassing most new techniques, the constraint imposed by the presence of a new transgenic DNA could exclude certain products from CTNBio's assessment, such as those created by genome editing, potentially generating a limbo for many new products. In fact, there seems to be a consensus among Brazilian scientists that not all products derived from the new breeding technologies (NBTs) should be regulated and assessed before being released, especially if they do not contain "foreign" DNA or RNA. CTNBio can, by law, decide how to resolve omissions in its

normative resolutions - and has often acted accordingly - in the assessment of genetically modified organisms. Therefore, it has the necessary tools to reach and apply its internal consensus to NBTs in an consistently science-oriented manner.

In conclusion, the authors would like to emphasize that the genesis of an efficient regulatory system naturally depends on a balance of forces between those interested in modern biotechnology and those opposed to it. If pro-biotech players are the determinants of the regulatory process, it will probably be based on risk assessment recommendations. If, on the other hand, the opinion of the opposition group prevails, socio-economic issues will be placed side-by-side in the risk assessment process, which confuses the risk assessor and leads to frequent deadlocks. However, irrespective of the many methodological approaches to GMO risk analysis, at the end of the day it is often political will that determines GMO regulatory processes [22].

5. References

1. Souza GD, Melo MA, Kido EA, Andrade PP. The Brazilian GMO Regulatory Scenario and the Adoption of Agricultural Biotechnology. *The World of Food Science*. 2013. <http://worldfoodscience.com/article/brazilian-gmo-regulatory-scenario-and-adoption-agricultural-biotechnology>. Accessed 02 jun 2017.
2. Contini E, Sampaio MJA, Avila AFD. The lack of clear GMO regulation: Its impact on researchers and farmers in Brazil. *International Journal of Biotechnology*. 2005; doi: 10.1504/IJBT.2005.006443.
3. Pelaez, V. State of exception in the regulation of genetically modified organisms in Brazil. *Sci. Pub.* 2009; doi: 10.3152/030234209X403235.
4. Lopes MA, Sampaio MJAM, Trigo E, Chudnovsky D, Cap E, López A. Approaching Biotechnology: Experiences from Brazil and Argentina. In: Meléndez-Ortiz R, Sánchez V, editors. *Trading in Genes: Development perspectives on Biotechnology, Trade and Sustainability*. London: Earthscan; 2005. P. 89-108.
5. EMBRAPA. Cronologia do embargo judicial. Technical text Embrapa Soja. 2003. http://www.cnpso.embrapa.br/download/cronologia_sojarr.pdf . Accessed 17 april 2017.

6. Mitre M, Reis B. Science, Expertise and Democracy: A Study of the Role of Scientists in Shaping the Regulation of Genetically Modified Organisms and Human Embryonic Stem-Cell Research in Brazil. APSA Annual Meeting Paper. 2010.<https://ssrn.com/abstract=1643183>. Accessed 17 April 2017.
7. Paes de Andrade P, Aragão FJ, Colli W, Dellagostin OA, Finardi-Filho F, Hirata MH, et al. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. Bull World Health Organ. 2016; doi: 10.2471/BLT.16.173377.
8. Wolt JD, Keese P, Raybould A, Fitzpatrick JW, Burachik M, Gray A, et al. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. Transgenic Res. 2010; doi: 10.1007/s11248-009-9321-9.
9. Andrade PP, Parrott W, Roca M. Guía para la evaluación de riesgo ambiental de organismos genéticamente modificados. 1st ed. São Paulo: Internacional Life Sciences Institute do Brasil; 2012.
10. Gaugitsch. Under the Cartagena Protocol on Biosafety - Where is the Roadmap for Risk Assessment Taking Us? Front Bioeng Biotechnol. 2016; doi: 10.3389/fbioe.2015.00212.
11. Reeves RG, Denton JA, Santucci F, Bryk J, Reed Floyd A. Scientific standards and the regulation of genetically modified insects. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012; doi: 10.1371/journal.pntd.0001502.
12. Waltz E. GM mosquitoes fire first salvo against Zika virus. Nature biotechnology. 2016; doi: 10.1038/nbt0316-221.
13. Sinkins SP, Gould F. Gene drive systems for insect disease vectors. Nature Reviews Genetics. 2006; doi: 10.1038/nrg1870.
14. Blenke OE, Evers MJW, E, Mastrobattista E, van der Oost J. CRISPR-Cas9 gene editing: Delivery aspects and therapeutic potential. Journal of Controlled Release. 2016; doi: 10.1016/j.jconrel.2016.08.002.
15. White MK, Kaminski R, Young W, Roehm PC, Khalili, K. CRISPR editing technology in biological and biomedical investigation. Journal of Cellular Biochemistry. 2017; doi: 10.1002/jcb.26099.
16. Burt A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2003; doi: 10.1098/rspb.2002.2319.
17. Wimmer EA. Insect biotechnology: Controllable replacement of disease vectors. Current Biology. 2013; doi: 10.1016/j.cub.2013.03.058.
18. Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015; doi: 10.1073/pnas.1521077112.

19. Brown, Z. 2017. "Economic, Regulatory and International Implications of Gene Drives in Agriculture." *Choices*. Quarter 2. Available online: <http://www.choicesmagazine.org/choices-magazine/submitted-articles/economic-regulatory-and-international-implications-of-gene-drives-in->
20. Oye KA, Esvelt K, Appleton E, Catteruccia F, Church, G, Kuiken T, et al. Regulating gene drives. *Science*. 2014; doi: 10.1126/science.1254287.
21. Roberts A, Andrade PP, Okumu F, Quemada H, Savadogo, M. Singh JA et al. Results from the Workshop "Problem Formulation for the Use of Gene Drive in Mosquitoes". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017; doi: 10.4269/ajtmh.16-0726.
22. Ludlow K, Smyth SJ, Falck-Zepeda J. *Socio-Economic Consideration in Biotechnology Regulation*. Springer:Verlag. 2014.

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

The Memórias' content is freely accessible to readers and no publication fees are charged to authors. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz has decided to simplify the requirements regarding the format of submitted manuscripts. From now on, all manuscripts may be submitted in any text format as long as the common subdivision of scientific articles are followed, e.g. introduction, materials and methods, results, discussion and references. For Reviews, Perspectives and similar articles, authors may use the sections that best suit the structure and content of the proposed manuscript. All manuscripts should contain, besides the title and abstract, full details of authors and institutions, acknowledgements of any technical or financial assistance as well as state any conflicts of interest. This flexible text format will be used for the initial analysis and peer review. If the manuscript is accepted, authors will be requested to edit the text in accordance with the publication style of the Memórias."

Upon acceptance, the manuscript should be arranged in the following format:

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references (must be up to 30 references), with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

Running title: not required

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Abstracts: Provide an abstract of between 250- 300 words (100 words in case of short communications, technical notes, genome announcements or reviews). Abstracts of original articles should be structured into 5 sections as follows: BACKGROUND, OBJECTIVES, METHODS, FINDINGS and MAIN CONCLUSIONS, each section addressing respectively the problem, the aim of the study, the main methodological approach, the most important findings and the conclusions of the study.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs x-y)
[Ex: An. (Nyssorhynchus) atacamensis González and Sallum, sp. nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)
[Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]

Diagnosis (or Description; all stages are described);

Type host (when it is the case);

Site of Infection (when it is the case);

Type-locality;

Type data and depository;

Other material examined (when it is the case);

Distribution;

Host-parasite data (such prevalence and other important data, when it is the same case);

Bionomics;

Etymology;

Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

Author's contribution: state each author's contribution to the work.

REFERENCES

MUST BE ACCURATE. ONLY CITATIONS THAT APPEAR IN THE TEXT SHOULD BE REFERENCED. UNPUBLISHED PAPERS, UNLESS ACCEPTED FOR PUBLICATION, SHOULD NOT BE CITED. WORK ACCEPTED FOR PUBLICATION SHOULD BE REFERRED TO AS "IN PRESS" AND A LETTER OF ACCEPTANCE OF THE JOURNAL MUST BE PROVIDED. UNPUBLISHED DATA SHOULD ONLY BE CITED IN THE TEXT AS "UNPUBLISHED OBSERVATIONS", AND A LETTER OF PERMISSION FROM THE AUTHOR MUST BE PROVIDED. THE REFERENCES AT THE END OF THE PAPER SHOULD BE LISTED IN NUMERICAL ORDER, AND IN THE SAME ORDER IN WHICH THEY ARE CITED IN TEXT. [CLICK HERE \[+\]](#)

FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Review: Papers in “review” format are accepted only by means of invitations made by the editor or associated editors.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Genome Announcement and Highlights: this section is dedicated to publish new genome information from eukaryote parasites, virus, bacteria and their respective vectors. Authors who wants a fast peer review and publication cycle for their research results covering new genome sequences, re-sequencing and comparative genome analysis as well as the expression pattern of genomes are invited to submitted papers under the short communication format.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication. Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

ONCE A PAPER IS ACCEPTED FOR PUBLICATION, THE AUTHORS MUST PROVIDE:

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA BMC PROCEEDINGS

Preparing your manuscript

This section provides general style and formatting information only. Formatting guidelines for specific article types can be found below.

General formatting guidelines

- [Preparing Main manuscript text](#)
- [Preparing illustrations and figures](#)
- [Preparing tables](#)
- [Preparing additional files](#)

Preparing main manuscript

- Use double line spacing
- Include line and page numbering
- Use SI units: Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF
- Do not use page breaks in your manuscript

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main

- manuscript document: Microsoft word (DOC,DOCX)
- Rich text format (RTF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)

Please note: editable files are required for processing in production. If your manuscript contains any non- editable files (such as PDFs) you will be required to re-submit an editable file when you submit your revised manuscript, or after editorial acceptance in case no revision is necessary.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file. For more information, see [Preparing figures](#) below.

Additional information for TeX/LaTeX users

Please use BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile if you use TeX format. Submit your references using either a bib or bbl file. When submitting TeX submissions, please submit both your TeX file and your bib/bbl file as manuscript files. Please also convert your TeX file into a PDF (please do not use a DIV file) and submit this PDF as a supplementary file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by our production team as a reference

point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

The Editorial Manager system checks for any errors in the Tex files. If an error is present then the system PDF will display LaTeX code and highlight and explain the error in a section beginning with an exclamation mark (!).

All relevant editable source files must be uploaded during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the production process.

TeX templates

[BioMedCentral_article](#) (ZIP format) - preferred template

[Springer_article](#) svjour3 (ZIP format)

[birkjour](#) (Birkhäuser, ZIP format)

[article](#) (part of the [standard TeX distribution](#))

[amsart](#) (part of the [standard TeX distribution](#))

Style and language

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Visiting the [English language tutorial](#) which covers the common mistakes
- when writing in English. Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates [Nature Research Editing Service](#) and [American Journal Experts](#). BMC authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services. To claim 10% off English editing from Nature Research Editing Service, click [here](#). To claim 10% off American Journal Experts, click [here](#).

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in the journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

Data and materials

For all journals, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely to be either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main paper or additional supporting files, in machine-readable format (such as spread sheets rather than PDFs) whenever possible. Please see the list of [recommended repositories](#) in our editorial policies.

For some journals, deposition of the data on which the conclusions of the manuscript rely is an absolute requirement. Please check the Instructions for Authors for the relevant journal and article type for journal specific policies.

For all manuscripts, information about data availability should be detailed in an 'Availability of data and materials' section. For more information on the content of this section, please see the Declarations section of the relevant journal's Instruction for Authors. For more information on BioMed Centrals policies on data availability, please see our [editorial policies].

Formatting the 'Availability of data and materials' section of your manuscript

The following format for the 'Availability of data and materials' section of your manuscript should be used:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http:// format]."

The following format is required when data are included as additional files:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) included within the article (and its additional file(s))."

BioMed Central endorses the Force 11 Data Citation Principles and requires that all publicly available datasets be fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a DOI.

For databases, this section should state the web/ftp address at which the database is available and any restrictions to its use by non-academics.

For software, this section should include:

- Project name: e.g. My bioinformatics project
- Project home page: e.g. <http://sourceforge.net/projects/mged>
- Archived version: DOI or unique identifier of archived software or code in repository (e.g. enodo) Operating system(s): e.g. Platform independent
- Programming language: e.g. Java

- Other requirements: e.g. Java 1.3.1 or higher, Tomcat 4.0 or higher License: e.g. GNU GPL, FreeBSD etc.
- Any restrictions to use by non-academics: e.g. licence needed

Information on available repositories for other types of scientific data, including clinical data, can be found in our [editorial policies](#).

References

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice.

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission. For further information including example references please read our reference preparation guidelines.

What should be cited?

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited.

Unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE.

Any in press articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

How to format your references

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style, they may need to be retyped and carefully proofread.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the

date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>.

Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med*. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999.
[http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998.
<http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing figures

When preparing figures, please follow the formatting instructions below.

- Figures should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file.
- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file that fits on a single page in portrait format. Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.

- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order. Figures should be uploaded in the correct orientation.
- Figure titles (max 15 words) and legends (max 300 words) should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- Figure keys should be incorporated into the graphic, not into the legend of the figure.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see our detailed instructions.
- Individual figure files should not exceed 10 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere.** in order for all figures to be open access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non open access journals. permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Figure file types

We accept the following file formats for figures:

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- PNG (suitable for images)
- BMP (suitable for images)
- CDX (ChemDraw - suitable for molecular structures)

For information and suggestions of suitable file formats for specific figure types, please see our [author academy](#).

Figure size and resolution

Figures are resized during publication of the final full text and PDF versions to conform to the BioMed Central standard dimensions, which are detailed below.

Figures on the web:

- width of 600 pixels (standard), 1200 pixels (high resolution).

Figures in the final PDF version:

- width of 85 mm for half page width figure width of 170 mm for full page width figure
- maximum height of 225 mm for figure and legend
- image resolution of approximately 300 dpi (dots per inch) at the final size

Figures should be designed such that all information, including text, is legible at these dimensions. All lines should be wider than 0.25 pt when constrained to standard figure widths. All fonts must be embedded.

4.1.1.1 Figure file compression

- Vector figures should if possible be submitted as PDF files, which are usually more compact than EPS files.
- TIFF files should be saved with LZW compression, which is lossless (decreases file size without decreasing quality) in order to minimize upload time.
- JPEG files should be saved at maximum quality.
- Conversion of images between file types (especially lossy formats such as JPEG) should be kept to a minimum to avoid degradation of quality.

If you have any questions or are experiencing a problem with figures, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

Preparing tables

[Back to top](#)

When preparing tables, please follow the formatting instructions below.

- Tables should be numbered and cited in the text in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, Table 2 etc.).
- Tables less than one A4 or Letter page in length can be placed in the appropriate location within the manuscript.
- Tables larger than one A4 or Letter page in length can be placed at the end of the document text file. Please cite and indicate where the table should appear at the relevant location in the text file so that the table can be added in the correct place during production.
- Larger datasets, or tables too wide for A4 or Letter landscape page can be uploaded as additional files. Please see [below] for more information.
- Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). Please use the standard file extensions.
- Table titles (max 15 words) should be included above the table, and legends (max 300 words) should be included underneath the table.

- Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files, but should be formatted using 'Table object' function in your word processing program.
- Color and shading may not be used. Parts of the table can be highlighted using superscript, numbering, lettering, symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend.
- Commas should not be used to indicate numerical values.

If you have any questions or are experiencing a problem with tables, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

Preparing additional files

[Back to top](#)

As the length and quantity of data is not restricted for many article types, authors can provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

All Additional files will be published along with the accepted article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files, if requested, should be sent by email to the journal's editorial email address, quoting the manuscript reference number. Please do not send completed patient consent forms unless requested.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" should be included as additional files. Since many web links and URLs rapidly become broken, BioMed Central requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. Do not include any individual participant details. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission. Each additional file should be cited in sequence within the main body of text.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

For further guidance on how to use Additional files or recommendations on how to present particular types of data or information, please see [How to use additional files](#).

ANEXO C – NORMAS DA REVISTA BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION

Guidelines for contributors

Bulletin of the World Health Organization 2018;96:75-76.

doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.18.990118>

1. Scope and editorial policy

4.1.1.2 1.1 Content

The mission of the *Bulletin of the World Health Organization* is “to publish and disseminate scientifically rigorous public health information of international significance that enables policy-makers, researchers and practitioners to be more effective; it aims to improve health, particularly among disadvantaged populations”.

The *Bulletin* welcomes a variety of unsolicited manuscripts (see below, 1.1.1.). These are initially screened in house for originality, relevance to an international public health audience and scientific rigour. If they pass the initial screening, they are sent to peer reviewers whose opinions are taken into account by the journal's editorial advisers when they decide whether to accept a manuscript for publication. Accepted papers are subject to editorial revision, which may involve substantive changes, shortening or restructuring the text and deleting superfluous tables and figures. The word limits given for each type of contribution do not include the abstract (where applicable), tables, boxes, figures and references or appendices, if any. The principal types of manuscripts are outlined below.

1.1.1 UNSOLICITED MANUSCRIPTS

We welcome unsolicited submissions to the Research, Systematic reviews, Policy & practice, Lessons from the field and Perspectives sections of the *Bulletin*. All manuscripts destined for the first four of these sections must include two paragraphs indicating what they add to the literature.

The paragraphs should briefly explain:

- what was already known about the topic concerned;
- what new knowledge the manuscript contributes.

RESEARCH

Research, methodologically rigorous, of relevance to international public health. Formal scientific presentations having not more than 3000 words and 50 references, plus a structured abstract (see below, 2.7); peer reviewed. As clear reporting is needed for readers and reviewers when judging the quality of research, studies should comply with the relevant reporting guidelines, available on the EQUATOR Network website, at: <http://www.equator-network.org/about-us/uk-equator-centre/equator-publications/equator-network-publications-2010/>. Operational and implementation research should be reported in compliance with the guidelines published in this issue (available at: http://www.who.int/bulletin/volumes/94/1/15-167585/en_1). Intervention trials as defined by WHO (i.e. “any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes”) require registration in a public trials registry acceptable to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) before submission, and the registration number must be provided at the end of the abstract. Acceptable registries are listed at: <http://www.who.int/ictrp/network/primary/en/>. Web publication constitutes prior publication. This includes institutional websites that are open to the general public.

SYSTEMATIC REVIEWS

Exhaustive, critical assessments of published and unpublished studies on research questions concerning interventions, policies or practices in public health, with meta-analysis when feasible. Not more than 3000 words plus a structured abstract (see below, 2.7); the number of references in accordance with the scope of the review; peer reviewed. How studies were included and excluded

should be illustrated in a flow diagram. Authors should strictly follow the reporting guidelines for systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) available at: <http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/prisma/>.

POLICY & PRACTICE

Analytical assessments, debates or hypothesis-generating papers; not more than 3000 words and 50 references, plus a non-structured abstract (see below, 2.7); peer reviewed.

LESSONS FROM THE FIELD

Papers that capture experiences and practice gained in solving specific public health problems in developing countries. Convincing evidence of effect should be provided. Not more than 1500 words and 15 references, plus a structured abstract (see below, 2.7); not more than one table and one figure; must include one box listing three lessons learnt; peer reviewed (see: <http://www.who.int/bulletin/volumes/84/1/3.pdf>). Operational and implementation research reports should follow the specifications described above for the research section.

PERSPECTIVES

Views, hypotheses or discussions (with a clear message) surrounding an issue of public health interest; up to 1500 words, no more than 12 references; peer reviewed.

COMMISSIONED MANUSCRIPTS

The categories of articles shown below are normally commissioned by the editors. Authors wishing to submit an unsolicited manuscript for one of these categories should first contact the editorial office (see below, 2.1).

EDITORIALS

Authoritative reviews, analyses or views of an important topic related to a theme or to one or more papers published in a given issue; not more than 800 words, maximum 12 references.

ROUND TABLES

A base paper on a controversial current topic in public health (not more than 2000 words and an abstract) is the core of a debate by several discussants invited to contribute not more than 500 words each.

4.1.1.3 1.2 Ethical issues

The World Health Organization (WHO) publishes the results of research involving human subjects only if fully compliant with ethical principles, including the provisions of the World Medical Association Declaration of Helsinki (as amended by the 59th General Assembly, Seoul, the Republic of Korea, October 2008; available at: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf>) and with the additional requirements, if any, of the country in which the research was carried out. Any manuscript describing the results of such research must contain a clear statement to this effect and should specify that the free and informed consent of the subjects or their legal guardians was obtained and that the relevant institutional or national ethics review board approved the investigation. The *Bulletin* is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE; see: <http://publicationethics.org>). Issues involving publication ethics may be referred to this committee by the editors. WHO Research Ethics Review Committee clearance is required for papers that report research supported by WHO or that are authored or co-authored by someone who was a WHO staff member while the research was conducted.

4.1.1.4 1.3 Competing interests

A competing interest arises when a professional judgement concerning a primary interest (such as patients' welfare or the validity of research) may be influenced by a secondary interest (such as financial gain or personal rivalry). We ask all authors to disclose at the time of submission any competing interests that they may have. Examples of competing interests may be found at: <http://www.icmje.org>. Further information on competing interests is available at: <http://www.who.int/bulletin/volumes/83/9/645.pdf>.

4.1.1.5 1.4 Funding

Authors should identify the sources that funded the work undertaken, affirm not having entered into an agreement with the funder that may have limited their ability to complete the research as planned, and indicate that they have had full control of all primary data.

4.1.1.6 1.5 Appeals process

Authors of rejected papers can appeal against the decision by following the procedures outlined in <http://www.who.int/bulletin/volumes/83/9/645.pdf>.

4.1.1 2. Preparation and submission of manuscripts

4.1.1.7 2.1 Correspondence

Manuscripts should be submitted to the *Bulletin* via our submissions website (<http://submit.bwho.org>), where full instructions are given. Queries about online submissions should be sent to: bulletin.submit.ask@who.int. Authors requiring assistance with online submission can contact the editorial office.

4.1.1.8 2.2 Uniform requirements

Manuscripts should be prepared in accordance with the *ICMJE recommendations for the conduct, reporting, editing and publication of scholarly work in medical journals*. The complete document is available at: <http://www.icmje.org/recommendations/>.

4.1.1.9 2.3 Languages

Manuscripts should be submitted in English and will be published in that language in the *Bulletin*; the abstracts are translated into Arabic, Chinese, French, Russian and Spanish.

4.1.1.10 2.4 Authorship

On the manuscript's title page authors should give their full names and the name, city and country of their institutions. The corresponding author must also provide a full postal address, which will be published with the email address unless otherwise requested. Academic titles and the names of departments and subdepartments are unnecessary and are discouraged for reasons of space. If an author has several affiliations, only the most important one should be provided. The criteria for authorship described in the *ICMJE recommendations* (see above, 2.2) must be rigorously observed. Each author should have participated sufficiently in the work being reported to take public responsibility for the paper's content and should describe in detail on the online submission system (not within the manuscript itself) his or her particular contribution. The *Bulletin* encourages submissions from authors in low- and middle-income countries, and in line with this policy at least one author should have a professional affiliation in the country where the study was conducted.

4.1.1.11 2.5 Licence for publication

The *Bulletin* is a fully open-access journal and charges no author fees. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce in their articles any material enjoying copyright protection. They should send the letter granting such permission to the editorial office when they submit their papers.

On submission, the corresponding author must indicate agreement on behalf of all authors that their submission, if accepted, will be published under the intergovernmental organizations' creative commons attribution licence (CCBY 3.0 IGO).

4.1.1.12 2.6 Figures, tables and boxes

These should be used only to enhance the understanding of the text, not to repeat what can be clearly communicated within the text. All figures, tables and boxes should be numbered consecutively (e.g. Fig. 1, Table 1 and Box 1).

4.1.1.13 2.7 Abstracts

Abstracts should highlight the text's most important points and should be provided for the following types of papers: Research, Systematic reviews, Policy & practice, base papers for Round tables and Lessons from the field. The abstract should not exceed 250 words. It appears in English at the

beginning of the paper and in Arabic, Chinese, French, Russian and Spanish between the end of the text and the reference list. Structured abstracts are required for Research papers and Systematic reviews (Objective, Methods, Findings, Conclusion) and for Lessons from the field papers (Problem, Approach, Local setting, Relevant changes, Lessons learnt).

4.1.1.14 2.8 Bibliographic references

Reference citations should be numbered consecutively as they occur in the text and references should be listed in accordance with the *ICMJE recommendations* (<http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>). The accuracy of all references is the authors' responsibility and authors are also responsible for dating access to URLs, providing a record of when they were active.

4.1.1.15 2.9 Maps

Papers should contain no maps unless an important finding cannot be conveyed without them or unless they are needed to make an essential point. Maps that show international borders, partially or in full, must be created from the following source, approved by the United Nations: <http://www.un.org/Depts/Cartographic/english/htmain.htm> following these standard operating

procedures: http://gamapserver.who.int/gho/gis/training/DMF_GIS2010_2_SOPSforWHOMaps.pdf. A vectorial EPS (Encapsulated PostScript) file must be submitted.

4.1.1.16 References

1. Hales S, Leshner-Trevino A, Ford N, Maher D, Ramsay A, Tran N. Reporting guidelines for implementation and operational research. *Bull World Health Organ*. 2016 Jan;94(1):58–64.