



\_título:

# \_Relatório Revive 2008 / 2009

\_sub.título:

*\_Programa Nacional de Vigilância de Vectores Culicídeos*

\_edição:

\_INSA,IP

\_autores:

**\_Maria João Alves, Hugo Osório, Líbia Zé-Zé, Fátima Amaro**

\_local / data:

\_Lisboa

\_Abril 2010

**\_Direcção Geral de Saúde - Divisão de Saúde Ambiental**

**\_INSA/DDI - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac**

**\_Administrações Regionais de Saúde**





1899



*Instituto Nacional de Saúde*  
**Doutor Ricardo Jorge, IP**

*Av. Padre Cruz 1649-016 Lisboa*

[www.insa.pt](http://www.insa.pt)

**t: 217 519 200 @: info@insa.min-saude.pt**



[www.insa.pt](http://www.insa.pt)



**Relatórios**

\_título:

# **Relatório Revive 2008 / 2009**

\_sub.título:

***Programa Nacional de Vigilância de Vectores Culicídeos***

\_edição:

**INSA, IP**

\_autores:

**Maria João Alves, Hugo Osório, Líbia Zé-Zé, Fátima Amaro**

**Direcção Geral de Saúde - Divisão de Saúde Ambiental**

**INSA/DDI - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac**

**Administrações Regionais de Saúde**

\_local / data:

**Lisboa**

**Abril 2010**



www.insa.pt



Relatório Revive 2008 / 2009  
Programa Nacional de  
Vigilância de Vetores Culicídeos

**Catlogação na publicação:**

**Relatório REVIVE 2008-2009.**

Relatório Revive 2008-2009 : Programa Nacional de Vigilância de Vetores Culicídeos / Maria João Alves... [et al.] Direcção-Geral de Saúde, Divisão de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambourmac, Administrações Regionais de Saúde. - Lisboa : INSA, IP - 2011.

ISBN: 978-972-8643-55-3

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2011.



Instituto Nacional de Saúde  
Doutor Ricardo Jorge

Direcção-Geral de Saúde  
www.dgs.pt



Ministério da Saúde



**Título:** Relatório Revive 2008-2009: Programa Nacional de Vigilância de Vetores Culicídeos

**Autores:** Maria João Alves, Hugo Osório, Líbia Zé-Zé, Fátima Amaro

Direcção-Geral de Saúde. Divisão de Saúde Ambiental

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambourmac, Administrações Regionais de Saúde

**Editor:** Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP)

**Design e Paginação:** Nuno Almodovar design **Impressão e acabamento:** DPI Cromotipo

**ISBN:** 978-972-8643-55-3 **Depósito Legal:** 326381 / 11

Lisboa, Abril de 2010

Edição apoiada pela Direcção-Geral da Saúde (\*)

(\*) **Protocolo REVIVE**, Programa Nacional de Vigilância de Vetores Colicídeos



<b>1. Introdução</b>	<b>006</b>
1.1. Rede de Vigilância de Vectores – REVIVE	007
1.2. Programas de vigilância	007
1.3. Mosquitos	008
1.3.1. <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	008
1.3.2. Espécies de mosquitos identificadas no programa REVIVE	009
1.4. Arbovírus	014
<b>2. Plano de Acção</b>	<b>016</b>
2.1. Formação	016
2.1.1. Acção de Formação	016
2.1.2. Manual	016
2.2. Equipamentos e metodologias	016
2.2.1. Campo	016
2.2.2. Selecção de locais e calendário de colheitas	017
2.2.3. Envio de amostras para o laboratório	018
2.2.4. Dados das colheitas	018
2.3. Laboratório	018
2.3.1. Identificação de culicídeos	018
2.3.2. Pesquisa de flavivírus	018
2.4. Dados do REVIVE	019
2.5. Divulgação dos resultados	019
<b>3. Resultados REVIVE 2008</b>	<b>020</b>
3.1. Colheitas de culicídeos	022
3.2. Identificação de culicídeos	024
3.3. Dados ecológicos	027
3.4. Pesquisa de flavivírus	028
3.4.1. <i>Pools</i>	028
3.4.2. Flavivírus	031
3.5. Conclusões	032
<b>4. Resultados REVIVE 2009</b>	<b>034</b>
4.1. Colheitas de culicídeos	036
4.2. Identificação de culicídeos	038
4.3. Dados ecológicos	041
4.4. Amostragem em Portos e Aeroportos	042
4.5. Pesquisa de flavivírus	043
4.6. Conclusões	046
<b>5. Resultados 2008/ 2009. Conclusões</b>	<b>048</b>
<b>6. Perspectivas futuras</b>	<b>056</b>
<b>7. Participantes REVIVE</b>	<b>057</b>
<b>8. Anexo</b>	<b>059</b>



## Índice de quadros

<b>Quadro 1:</b> Resumo dos resultados das colheitas efectuadas em 2008.	021
<b>Quadro 2:</b> Número de colheitas, de larvas e mosquitos adultos. Sucesso de captura por mês.	022
<b>Quadro 3:</b> Número de colheitas, de larvas e de mosquitos adultos. Sucesso de captura por região.	022
<b>Quadro 4:</b> Amostragem de larvas e mosquitos adultos por concelho.	023
<b>Quadro 5:</b> Espécies, estágio, número de mosquitos capturados e abundância.	024
<b>Quadro 6:</b> Espécies e estádios de mosquito colhidos por mês no período de amostragem.	026
<b>Quadro 7:</b> Número de colheitas, adultos e espécies. Sucesso de captura e espécie mais abundante por habitat em 2008.	027
<b>Quadro 8:</b> Colheitas, número total de larvas e espécies colhidas por tipo de habitat/criadouro.	028
<b>Quadro 9:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos fêmeas processados por região.	029
<b>Quadro 10:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos processados por ARS e por concelho em 2008.	029
<b>Quadro 11:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos processados por espécie.	030
<b>Quadro 12:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos processados por data.	031
<b>Quadro 13:</b> Resumo dos resultados de amostragem.	035
<b>Quadro 14:</b> Número de colheitas, de larvas e de mosquitos adultos. Sucesso de captura por mês.	036
<b>Quadro 15:</b> Número de colheitas, de larvas e de mosquitos adultos. Sucesso de captura por região.	037
<b>Quadro 16:</b> Amostragem de larvas e mosquitos adultos por concelho.	037
<b>Quadro 17:</b> Espécies, números de mosquitos capturados e abundância.	039
<b>Quadro 18:</b> Espécies de mosquitos detectadas por mês no período de amostragem.	040
<b>Quadro 19:</b> Número de colheitas, adultos e espécies. Sucesso de captura e espécie mais abundante por habitat em 2009.	041
<b>Quadro 20:</b> Colheitas, número total de larvas e espécies colhidas por tipo de habitat/criadouro.	042
<b>Quadro 21:</b> Espécies de culicídeos identificadas em portos e aeroportos.	043
<b>Quadro 22:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos processados por cada ARS.	043
<b>Quadro 23:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos processados por ARS e por concelho.	044
<b>Quadro 24:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos processados por data.	045
<b>Quadro 25:</b> Número de <i>pools</i> e de mosquitos processados por espécie.	045
<b>Quadro 26:</b> Comparação dos resultados de amostragem 2008/2009.	049
<b>Quadro 27:</b> Espécies de culicídeos identificadas em 2008 e em 2009 em ambos os estádios.	052
<b>Quadro 28:</b> Locais, espécies e meses em que foram identificados flavivírus de mosquitos.	053



---

## *Índice de figuras*

<b>Figura 1:</b> Armadilha tipo CDC para colheita de culicídeos adultos.	017
<b>Figura 2:</b> Caço para recolha de estádios imaturos de mosquitos em criadouros aquáticos.	017
<b>Figura 3:</b> Concelhos de Portugal em que foram feitas colheitas de culicídeos em 2008.	021
<b>Figura 4:</b> Totais de colheitas efectuadas em 2008.	022
<b>Figura 5:</b> Mapa de distribuição de espécies de culicídeos em Portugal continental. REVIVE 2008.	032
<b>Figura 6:</b> Concelhos de Portugal em que foram feitas colheitas de culicídeos em 2009.	035
<b>Figura 7:</b> Totais de colheitas efectuadas em 2009.	036
<b>Figura 8:</b> Mapa de distribuição de espécies de culicídeos em Portugal continental. REVIVE 2009.	047
<b>Figura 9:</b> Concelhos de Portugal em que foram feitas colheitas de culicídeos em 2008 e 2009.	049
<b>Figura 10:</b> Número de larvas e adultos e sucesso de captura em 2008.	050
<b>Figura 11:</b> Número de larvas e adultos e sucesso de captura em 2009.	050
<b>Figura 12:</b> Número de colheitas e sucesso de captura por ARS em 2008.	051
<b>Figura 13:</b> Número de colheitas e sucesso de captura por ARS em 2009.	051
<b>Figura 14:</b> Mapa de distribuição de espécies de culicídeos. REVIVE 2008 e 2009.	054

01

# \_introdução



[www.insa.pt](http://www.insa.pt)



Relatório Revive 2008 / 2009  
Programa Nacional de  
Vigilância de Vectores Culicídeos

As doenças transmitidas por vectores têm emergido, ou re-emergido, como resultado de alterações de práticas de Saúde Pública, alterações climáticas, demográficas e sociais, alterações genéticas nos agentes patogénicos, resistência dos vectores a insecticidas e inversão da importância dada à resposta à emergência em detrimento da prevenção.

Existe uma preocupação crescente das autoridades de Saúde Pública da Europa com a probabilidade de introdução de novos vectores em determinadas zonas geográficas, assim como com a possibilidade de surgimento de surtos inesperados e provocados por agentes etiológicos que ou nunca estiveram presentes, ou há muito tempo estavam esquecidos na realidade europeia.

O *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) criou recentemente um *Programme on emerging and vector-borne diseases* e uma rede de vigilância de vectores a nível de toda a Europa.

O Regulamento Sanitário Internacional (D.R. 1.ª série, N.º 16 de 23 de Janeiro de 2008) preconiza, no Anexo 1 e 5, o estabelecimento de programas de vigilância e controlo de vectores no perímetro de portos e aeroportos.

A maior parte dos agentes de doença transmitidos por vectores exibem um padrão sazonal distinto, o que sugere, muito claramente, que os parâmetros climáticos são importantes na epidemiologia das doenças transmitidas por vectores. Alguns factores climáticos como a temperatura, a precipitação, a humidade e a velocidade e direcção do vento influenciam fortemente a ecologia, desenvolvimento, comportamento e sobrevivência dos vectores e hospedeiros e, conseqüentemente, a dinâmica da transmissão da doença.

A importância da criação de uma Rede de Vigilância de Vectores (REVIVE) deveu-se sobretudo à necessidade de instalar capacidades e de saber exactamente que espécies de vectores estão



presentes, e em que regiões, assim como qual a sua capacidade vectorial.

Privilegiando a prevenção, em detrimento da resposta à emergência, a vigilância vai permitir que qualquer alteração na abundância, na diversidade e no papel de vector, detectada atempadamente, leve à actuação, pelas autoridades de Saúde Pública, no sentido de controlar as populações de culicídeos.

### 1.1. Rede de Vigilância de Vectores – REVIVE

O REVIVE (Rede de Vigilância de Vectores) resulta da colaboração entre instituições do Ministério da Saúde.

Em 2007 foi aprovado o Programa Nacional de Vigilância de Vectores Culicídeos<sup>1</sup> e assinado o Protocolo entre a Direcção Geral de Saúde, as Administrações Regionais de Saúde do Alentejo, Algarve, Centro, Lisboa e vale do Tejo e Norte e o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Os objectivos do Protocolo, aprovado para 2008 e 2009, contemplavam:

\_A criação de formas de campanha de educação, informação da população e comunidade médica;

\_A criação de condições para que as colheitas, periódicas ou esporádicas, de vectores culicídeos fossem realizadas pelas respectivas ARS's;

\_A vigilância da actividade de mosquitos vectores, caracterização das espécies e da ocorrência sazonal em locais seleccionados, assim como a detecção atempada da introdução de mosquitos exóticos, nomeadamente *Aedes albopictus* e *Ae. aegypti*;

\_A emissão de alertas para adequação de medidas de controlo, em função da densidade de vectores identificada.

(1) Em anexo

### 1.2. Programas de vigilância

Os programas de vigilância servem para antecipar e prevenir ou controlar as doenças em humanos ou animais. Um programa de vigilância é um sistema organizado de recolha de dados que, para as doenças transmitidas por vectores, compreende quatro componentes:

1. Detecção da doença em humanos ou animais domésticos;
2. Vigilância nos vectores;
3. Vigilância da actividade patogénica em hospedeiros silváticos;
4. Estudo das condições climáticas relacionadas com a transmissão do agente patogénico.

Os programas de vigilância também se distinguem por serem intensivos (colheitas de dados de uma ou duas espécies de vectores em pequenas áreas geográficas) ou extensivos, (estudo de muitas espécies em grandes áreas geográficas), sendo os primeiros os sistemas mais utilizados até agora, representados por pequenos projectos auto-financiados ou de financiamento externo e com uma duração limitada, e os segundos os chamados Programas de Vigilância.

Em função dos objectivos propostos, os trabalhos cujos resultados são aqui apresentados vão sobretudo incidir no ponto 2 - Vigilância nos vectores.

O REVIVE foi aprovado por um período de dois anos, sendo, no entanto, muito importante o facto de ser o primeiro programa deste tipo a ser implementado, dotando as instituições envolvidas de equipamento e experiência para futuras colaborações neste âmbito.



### 1.3. Mosquitos

Mosquitos são insectos (ordem *Diptera*, família *Culicidae*) conhecidos por picarem e causarem incómodo ao homem. Estes insectos têm uma tromba (probóscide) adaptada à sucção de líquidos como néctar, seiva ou sangue. Só as fêmeas fazem refeições de sangue, através da picada, do qual necessitam para efectuarem a postura dos ovos.

Os mosquitos passam por uma metamorfose completa durante o seu ciclo de vida, que compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e mosquito adulto. A duração das três primeiras fases depende da espécie e da temperatura. O ovo, a larva e a pupa desenvolvem-se, obrigatoriamente, na água.

Os mosquitos reproduzem-se em ambientes de água doce ou salobra, ou seja, lagos, lagoas, charcos, fontes e piscinas com água estagnada, latas, vasos, pneus e outros recipientes abandonados que podem reter água da chuva. A capacidade de voo dos mosquitos adultos é limitada, logo a sua presença indica a proximidade de um local de criação.

Em Portugal, o estudo da fauna de culicídeos começou em 1901 com Sarmiento & França <sup>2</sup>. No entanto, só em 1931 foi publicada uma monografia com a descrição de 21 espécies <sup>3</sup>. O estudo de mosquitos de Portugal continuou com os trabalhos de Cambournac (1938, 1943 e 1976), entre outros investigadores. Entre 1977 e 1988 a fauna de mosquitos de Portugal foi sistematicamente estudada por Ribeiro e colaboradores. Como resultado deste trabalho surgiu, pela primeira vez, uma lista de 40 espécies de mosquitos de Portugal Continental <sup>4</sup>.

Em 1999 foi publicada uma chave de identificação de mosquitos de Portugal Continental, Açores e Madeira actualizada com mais cinco espécies, totalizando 45 espécies e subespécies distribuídas por 15 subgéneros e sete géneros.

Estão incluídas as espécies *Aedes aegypti* (L.), que não é encontrada em Portugal desde 1956, e *Ae. albopictus* (Skusa), nunca detectada em Portugal, pela sua potencial introdução <sup>5</sup>.

#### 1.3.1. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

As espécies *Aedes aegypti* (L.) e *Ae. albopictus* (Skuse) estão disseminadas em muitas regiões do globo e a sua presença traduz-se num elevado impacto em Saúde Pública. São consideradas espécies invasoras e a sua potencial introdução pode causar impacto económico, ambiental ou na saúde humana.

Estas espécies são vectores primários de vários e importantes arbovírus.

*Ae. aegypti* é um mosquito de origem africana que ocupa praticamente todas as regiões tropicais e sub-tropicais. Os criadouros estão usualmente situados perto de habitações humanas, voando pequenas distâncias de mais ou menos 200 metros.

*Ae. aegypti* é o vector primário de febre amarela e dengue, entre outros. Estes vírus colocam potencialmente em risco cerca de dois mil milhões de pessoas que habitam as regiões tropicais e sub-tropicais.

(2) Sarmiento, M. & França, C. 1901. Nota sobre alguns culicídeos portugueses. Ver. Port. Med. Cir. Prat. (*Separatum*), Lisboa.

(3) J. M. Braga. 1931. *Culicídeos de Portugal*. Instituto de Zoologia da Universidade do Porto. Porto, Portugal.

(4) Ribeiro, H., Ramos, H.C., Pires, C.A. & R.A. Capela. 1988. An annotated checklist of the mosquitoes of continental Portugal (Diptera: Culicidae). *Actas do III Congresso Ibérico de Entomologia*, pp. 233-253.

(5) Ribeiro, H. & H.C. Ramos. 1999. Identification keys of the mosquitoes of Continental Portugal, Açores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, 3, pp. 1-11.



A detecção de *Ae. aegypti* na ilha da Madeira, em 2004 <sup>6</sup>, e a sua provável re-introdução em Portugal continental (onde não é detectado desde 1956) a partir da Madeira, ou de outra região, deve preocupar as autoridades de saúde, uma vez que este é um vector competente para a transmissão de arbovírus, como o vírus febre amarela, dengue e chikungunya, e tem características, assim como *Ae. albopictus*, para se tornar invasor.

*Ae. albopictus* é um membro do subgénero *Stegomyia*. Este mosquito (*asian tiger mosquito*) é oriundo do sudoeste asiático, das ilhas do Pacífico Oeste e do Oceano Índico, no entanto, nas últimas décadas, depois de ter aparecido nas ilhas do Pacífico Este no início do século XX, disseminou-se por África, Médio Oriente, Europa, América do Norte e do Sul.

Os seus ovos, encontrados em contentores naturais e artificiais, são muito resistentes, sobretudo à ausência de água. A disseminação desta espécie resultou, aparentemente, do transporte em navios de pneus com ovos em dormência <sup>7</sup>.

Na Europa, em especial nos países mediterrânicos que reúnem as condições necessárias à sobrevivência de *Ae. albopictus*, foi introduzido, primeiro, na Albânia em 1979; mais tarde em Itália em 1990. Nos cinco anos seguintes o mosquito introduzido foi encontrado em dez regiões, 19 províncias, de Itália. Em Itália, o processo de colonização deverá ter sido idêntico ao dos EUA, provavelmente porque em ambos os casos as infestações derivaram de sucessivas introduções, cada uma com um grande número de indivíduos. Em Setembro de 2004 foi descrita a presença de *Ae. albopictus* perto de Barcelona e, posteriormente,

na Holanda, em estufas de plantas, e na Alemanha.

O mosquito *Ae. albopictus* demonstrou experimentalmente ser competente para a transmissão de mais de 20 vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus), como por exemplo dengue, febre amarela, *west nile*, encefalite japonesa e chikungunya <sup>8,9</sup>.

A introdução de *Ae. albopictus* na fauna europeia aumentou o risco de ocorrência de surtos provocados por arbovírus em vários países, tendo-se já confirmado esta tendência com um surto de chikungunya, em Itália, em 2007.

Os estudos de impacto de alterações climáticas, a curto e longo prazo, demonstram que a maior parte da Europa se tornará favorável ao estabelecimento de *Ae. albopictus* <sup>10</sup>.

A introdução de *Ae. albopictus*, ou reintrodução de *Ae. aegypti*, em Portugal, possivelmente favorecida pelas mudanças climáticas e o aquecimento global que se tem verificado, acresce o perigo de transmissão autóctone de arbovírus. O aumento de migrações humanas, de regiões onde estas doenças são endémicas, eleva a probabilidade de importação dos agentes virais, bastando a presença do vector para se justificarem acções de vigilância e controlo por parte das autoridades de Saúde Pública.

### 1.3.2. Espécies de mosquitos identificadas no programa REVIVE

No programa REVIVE foram identificadas 18 espécies de culicídeos em diferentes estádios de

(6) Margarida, Y., Santos Grácio, A.J., Lencastre, I., Silva, A.C., Novo, T. & C. Sousa. 2006. First record of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1962) (Diptera, Culicidae) in Madeira Island - Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa* 13, pp. 59-61.

(7) Knudsen, A.B. 1995. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia*, 37 (2-3), pp. 91-97.

(8) Gratz, N.G. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical Veterinary Entomology*, 18 (3), pp. 215-227.

(9) Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marquès, E., Molina, R. & S. Roiz. 2005. Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges for Spain. *Biological Invasions*, 7 (1) pp. 87-97.

(10) [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0905\\_TER\\_Development\\_of\\_Aedes\\_Alboipictus\\_Risk\\_Maps.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0905_TER_Development_of_Aedes_Alboipictus_Risk_Maps.pdf)



desenvolvimento. Apresenta-se aqui, para cada uma das espécies, uma breve descrição (origem, distribuição, criadouros, hábitos alimentares, entre outros) de acordo com a bibliografia <sup>11,12</sup>.

### ***Anopheles (Anopheles) algeriensis***

#### **Theobald, 1903**

Espécie típica da sub-região Mediterrânica Paleártica, amplamente distribuída no Sul da Europa, Médio Oriente e Norte de África.

Nos países temperados *An. algeriensis* hiberna no estágio larval, mas as fêmeas, encontradas principalmente na Primavera e no Outono, podem sobreviver na estação fria.

Os criadouros de larvas são geralmente pântanos com vegetação e sombra. A água é doce ou ligeiramente salobra.

Os adultos repousam na vegetação e raramente entram em casas ou estábulos.

As fêmeas são zoofílicas, picando humanos e animais selvagens na proximidade dos seus criadouros.

Potencialmente, esta espécie pode transmitir a malária, apesar de o seu papel na transmissão ser insignificante devido à sua pouca abundância.

### ***Anopheles (Anopheles) claviger***

#### **s.l. Meigen, 1804**

Espécie distribuída na região Paleártica Ocidental, desde a Escandinávia ao Norte de África, ocorrendo na China e na Sibéria Central.

Os criadouros de larvas são geralmente permanentes e a hibernação no período de Inverno dá-se no estágio larvar.

A primeira geração de adultos ocorre na Primavera e a segunda no final do Verão.

As larvas desenvolvem-se em criadouros com água límpida, fria e com sombra.

Os adultos não voam a mais do que 100 metros de distância dos seus criadouros.

As fêmeas são zoofílicas, picando humanos e animais domésticos. Geralmente não entram nas habitações ou estábulos.

*An. claviger* é vector da malária e é suspeito de estar envolvido na transmissão de outros agentes patogénicos, como os vírus Tahyna e Batai (*Bunyaviridae*), o vírus da mixomatose e as bactérias anaplasma, borrelia e tularémia.

### ***Anopheles (Anopheles) maculipennis s.l.***

#### **Meigen, 1818**

Os membros do complexo maculipennis são indistinguíveis morfológicamente, só podendo ser correctamente identificados através da morfologia do ovo ou por estudos genéticos.

As larvas desenvolvem-se em criadouros de águas calmas, limpas e expostas ao sol, podendo ser ligeiramente salobras como, por exemplo, pântanos costeiros, canais de irrigação e arrozais. Podem entrar em casas e estábulos, onde são frequentemente encontrados em repouso.

*Anopheles atroparvus*, membro do complexo maculipennis, é uma espécie Paleártica ocidental da sub-região Mediterrânica e está distribuída em Portugal Continental, tendo sido o principal vector da malária antes da erradicação da doença no país. É também um importante vector de arbovírus, como o vírus *West Nile* já isolado em Portugal a partir desta espécie.

(11) Ribeiro, H. & H.C. Ramos. 1999. Identification keys of the mosquitoes of Continental Portugal, Açores and Madeira. European Mosquito Bulletin, 3, pp. 1-11.

(12) Schaffner, E. Angel, G. Geoffroy, B. Hervy, J-P. et al. *The Mosquitoes of Europe: An identification and Training Programme*. IRD editions; 2001 (CD-ROM).



***Anopheles (Anopheles) plumbeus***

**Stephens, 1828**

Espécie Paleártica com distribuição generalizada em Portugal.

As larvas são encontradas durante todo o ano e os criadouros desta espécie tipicamente da floresta são buracos nos troncos das árvores.

Os ovos são aparentemente resistentes ao congelamento e dessecação.

Pica o homem e é um potencial vector da malária, mas devido à sua generalizada pouca abundância não tem importância médica.

***Coquilletidea (Coquillettidia) richiardii***

**Ficalbi, 1899**

Espécie Paleártica Euro-Siberiana distribuída pela Europa, Médio-Oriente e Sibéria.

O desenvolvimento larvar é lento, eclodindo as larvas no Outono e emergindo os adultos na Primavera.

As larvas possuem um sifão respiratório adaptado a perfurar as raízes de plantas aquáticas para respirar o oxigénio presente nos tecidos das plantas.

Os criadouros são, geralmente, permanentes, com vegetação típica, como plantas do género *Phragmites* e *Typha*. Os adultos não voam longe dos seus criadouros.

As fêmeas picam humanos, geralmente ao escurecer e à noite. Podem estar naturalmente infectadas com vírus Batai, Tahyna e *West Nile*, não sendo conhecido, no entanto, o seu papel na transmissão destes agentes.

***Culiseta (Culiseta) annulata***

**Schrank, 1776**

Espécie Paleártica com distribuição generalizada na Europa e regiões Norte do Mediterrâneo.

Os adultos emergem no final do Verão e hibernam em casas, estábulos, cavernas ou buracos de árvores. As fêmeas fecundadas colocam os ovos na Primavera seguinte.

Os criadouros larvares são muito variados, incluindo locais naturais, como charcos ricos em matéria orgânica e canais de irrigação ou locais artificiais, como pneus abandonados.

As larvas podem tolerar água salobra e são encontradas em grande abundância em águas ricas em nitrogénio.

As fêmeas picam todos os vertebrados de sangue quente, incluindo humanos, mas preferencialmente aves. São geralmente nocturnas e entram em casas e estábulos para fazerem a refeição de sangue.

*Cs. annulata* é vector do vírus da mixomatose e está envolvido na transmissão da malária aviária. É também potencial vector do vírus Tahyna.

***Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata***

**Macquart, 1838**

Distribuição ampla e descontínua, incluindo a região Paleártica Central e Sul e a região Afrotropical e Oriental.

Apresenta diapausa em larva nas regiões temperadas e em fêmea nas regiões frias. Os adultos estão presentes durante todo o ano, com máxima densidade na Primavera e Verão.

Os criadouros das larvas são muito variados - contentores abandonados, arrozais, canais de irrigação, tanques de rega etc. - mas normalmente



são águas estagnadas ricas em matéria orgânica. Os criadouros podem ser temporários ou permanentes, à sombra ou expostos à radiação solar, de água doce ou salobra e de água límpida ou poluída.

As fêmeas picam mais frequentemente aves, ocorrendo, raramente, refeições de sangue em humanos. Ocasionalmente podem entrar em casas e estábulos. É um mosquito zoofílico e não é conhecido por transmitir agentes patogénicos ao homem.

#### ***Culex (Maillottia) hortensis Ficalbi, 1889***

Espécie Paleártica com distribuição na Europa (excepto Norte).

As larvas estão presentes desde meados da Primavera até ao Outono, desaparecendo nos primeiros dias frios. Durante o Inverno, as fêmeas procuram abrigo em caves, celeiros e ruínas.

Os criadouros larvares são muito variados, mas normalmente são pequenos, por exemplo, buracos nas rochas. Podem também ser criadouros ricos em plantas. A água dos criadouros é geralmente estagnada e exposta ao sol.

As fêmeas não picam mamíferos, preferindo batráquios e répteis. Sem importância médica.

#### ***Culex (Neoculex) impudicus Ficalbi, 1870***

Espécie Paleártica endémica da sub-região mediterrânea. A sua distribuição estende-se até ao Irão e esta espécie é considerada a variante sul da espécie *Culex torrentium*, cujas larvas são morfologicamente semelhantes.

Pode ser encontrado no estágio larvar desde o início da Primavera até ao final do Outono.

As fêmeas hibernam no Inverno em caves naturais e fazem uma postura de ovos na Primavera.

As larvas são encontradas em criadouros de águas frescas, limpas e à sombra.

As fêmeas parecem preferir fazer a refeição de sangue em batráquios, não sendo conhecido o seu papel na transmissão de agentes patogénicos aos humanos.

#### ***Culex (Neoculex) territans Walker, 1856***

Espécie Holoártica presente no Norte da América ocorre raramente na sub-região Mediterrânica da região Paleártica. Em Portugal é mais comum no norte.

As larvas estão presentes de meados da Primavera ao final do Outono. As larvas podem ser encontradas numa grande variedade de criadouros, permanentes (lagos) ou temporários (pequenos charcos), sendo comum a água limpa e à sombra, bem como a presença da espécie vegetal *Lemna sp.*

São as fêmeas que hibernam no Inverno, em locais naturais como buracos de árvores, ou artificiais, como celeiros.

As fêmeas alimentam-se preferencialmente de anfíbios. Esta espécie não apresenta importância médica.

#### ***Culex (Culex) laticinctus Edwards, 1913***

Espécie amplamente distribuída na região Mediterrânica, ocorrendo também na região Afrotropical Norte, ilhas Canárias e Médio Oriente. A sua biologia é pouco conhecida.

As larvas e adultos estão presentes nos meses de Verão e são provavelmente as fêmeas que hibernam no Inverno.

Os criadouros de larvas são muito variados, mas em comum têm a água estagnada.

As fêmeas são frequentes em habitações e não é conhecida a picada em humanos, não tendo, assim, importância médica.



***Culex (Culex) perexiguus Theobald, 1903***

Espécie amplamente distribuída na região Afrotropical e presente na sub-região Mediterrânica. Abundante nos meses de Verão e Outono.

As larvas desenvolvem-se em criadouros domésticos (vasos de plantas) ou naturais (linhas de água) e a água é geralmente límpida.

É pouco conhecida a biologia dos adultos. As fêmeas parecem preferir aves, no entanto podem picar humanos, principalmente no período nocturno.

É vector de vários arbovírus, incluindo o vírus *West Nile*.

***Culex (Culex) pipiens Linnaeus, 1758***

Espécie nominal do complexo pipiens, é Paleártica, encontrando-se também na sub-região africana e na América.

Este é um dos mosquitos mais comuns em Portugal, estando abundantemente distribuído em todas as regiões. É abundante durante o Verão e Outono.

As larvas desenvolvem-se em águas muito poluídas ou muito ricas em matéria orgânica.

As fêmeas hibernam em celeiros, estábulos ou em caves naturais. As fêmeas picam todos os vertebrados de sangue quente.

*Cx. pipiens* está envolvido na circulação de vários arbovírus na natureza, incluindo o vírus *West Nile*.

***Culex (Culex) theileri Theobald, 1903***

Espécie amplamente distribuída na sub-região Mediterrânica da região Paleártica, sub-região sudeste africana da região Afrotropical e norte da região Oriental.

Apresenta duas a três gerações por ano, estando muito presente nos meses de Verão e Outono. Esta espécie hiberna no estágio de adulto.

As larvas podem ser encontradas numa grande variedade de criadouros, arrozais, canais de irrigação, tanques de rega etc., onde a água é geralmente doce ou ligeiramente salobra. É um dos mosquitos mais comuns em Portugal.

As fêmeas alimentam-se em mamíferos e geralmente no exterior, podendo, no entanto, entrar em casas e estábulos para picarem humanos.

*Cx. theileri* é conhecido por estar envolvido na circulação de vários arbovírus na natureza, nomeadamente o vírus *West Nile*, embora não se conheça bem o seu papel na transmissão.

***Culex (Culex) torrentium Martini, 1925***

Espécie Paleártica, incluindo o Norte da Europa e a Ásia Central. Apresenta várias gerações por ano e está presente desde o início da Primavera ao início do Outono.

As larvas podem ser encontradas numa grande variedade de criadouros, desde buracos de rochas a pneus abandonados. Os criadouros são normalmente pequenos.

As fêmeas hibernam, normalmente, em caves e celeiros. As fêmeas são consideradas ornitófilicas e vectores do vírus Sindbis.

***Ochlerotatus (Ochlerotatus) caspius caspius Pallas, 1771***

Espécie amplamente distribuída na região Paleártica. Mosquito halófilico distribuído abundantemente por todas as regiões de Portugal, principalmente ao longo da costa marítima. Passa o Inverno no estágio de ovo.



Os adultos estão presentes o ano todo, mas são muito abundantes na Primavera e nos meses de Verão. Apresenta várias gerações por ano.

As larvas estão presentes em criadouros de água salobra onde a presença de vegetação abundante é comum.

As fêmeas picam todos os vertebrados de sangue quente, principalmente no exterior. É um mosquito praga muito antropofílico e vector do vírus da mixomatose e do arbovírus Tahyna. Pode ser naturalmente infectado com o vírus *West Nile*.

***Ochlerotatus (Ochlerotatus) detritus***  
**Haliday, 1833**

Espécie halofílica característica da costa marítima e das regiões salinas paleárticas.

Os criadouros das larvas são geralmente de água salobra na região costeira e são de grande volume, como por exemplo salinas abandonadas.

As fêmeas picam todos os vertebrados de sangue quente e são particularmente agressivas com os humanos, principalmente ao escurecer. Raramente entram em habitações. As fêmeas podem voar mais de 10 quilómetros em busca de uma refeição sanguínea. *Oc. detritus* é vector do vírus da mixomatose.

***Uranotaenia unguiculata* Edwards, 1913**

Espécie Mediterrânica conhecida desde a Península Ibérica até ao Paquistão.

As larvas desenvolvem-se em criadouros ricos em matéria orgânica de origem vegetal.

São provavelmente as fêmeas que hibernam no Inverno. As fêmeas não picam humanos, nem aparentemente, outros mamíferos. Este género não tem importância médica.

## 1.4. Arbovírus

Os mosquitos podem estar infectados com vírus, bactérias ou protozoários e, nesse caso, podem transmitir, durante a picada, doenças ao Homem.

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes. A palavra é o acrónimo do inglês de *arthropod borne virus* e tem sido utilizada, desde 1957, para descrever, ecologicamente, vírus, quase todos com genoma de RNA, e pertencentes a famílias distintas.

O género *Flavivirus* da família *Flaviviridae* engloba cerca de 70 vírus, alguns dos quais, como o vírus dengue, encefalite japonesa, encefalite de St. Louis, febre amarela e *west nile*, são importantes agentes patogénicos humanos. Estes vírus causam problemas sérios de Saúde Pública e, em certas regiões, surgem inesperadamente. O vírus protótipo deste grupo é o vírus da febre amarela.

Os vectores artrópodes mais associados à transmissão dos flavivírus são os mosquitos (dengue, febre amarela, vírus *west nile*) e as carraças (encefalite transmitida por carraças). No entanto, os flavivírus apresentam uma ampla diversidade de vectores artrópodes e hospedeiros vertebrados associados à transmissão biológica e uma extensa distribuição geográfica.

O género *Alphavirus*, da família *Togaviridae*, engloba 24 espécies de vírus transmitidos por mosquitos e outros artrópodes hematófagos, entre eles o vírus Chikungunya, que provoca uma síndrome com início súbito com sinais e sintomas como febre elevada, acompanhada de artralgias e mialgias intensas que imobilizam os doentes.

Este vírus, transmitido por *Aedes aegypti*, normalmente ocorria em África e no sudoeste asiático, tendo surgido, a partir de 2006, um surto com cerca de um milhão de casos em todas as



---

regiões do Oceano Índico e com o mosquito  
*Aedes albopictus* como vector.

Foram descritos centenas de casos de infecções por vírus chikungunya em turistas que regressam à Europa e, em 2007, aconteceu um surto de cerca de 200 casos na região de Emilia-Romagna, em Itália <sup>13</sup>, a partir de um único viajante virémico, uma vez que o mosquito *Aedes albopictus* é, nesta região de Itália, a espécie mais abundante.

---

(13) Angelini, P, *et al*, 2008. Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parassitologia* 50 (1-2): 97-98.

# \_plano de acção



[www.insa.pt](http://www.insa.pt)



Relatório Revive 2008 / 2009  
Programa Nacional de  
Vigilância de Vectors Culicídeos

## 2.1. Formação

### 2.1.1. Acção de Formação

Para iniciar o REVIVE foi organizada uma Acção de Formação destinada aos colaboradores REVIVE e a outros técnicos das Administrações Regionais de Saúde.

A Acção de Formação decorreu nas instalações do INSA no dia 28 de Março de 2008 e contou com a participação de 48 técnicos de todo o país.

Do programa constava uma componente teórica com noções básicas de epidemiologia, biologia de vectores e agentes transmitidos, métodos de detecção de agentes etiológicos, noções de vigilância, controlo e prevenção de vectores culicídeos e uma componente prática com observação de amostras, demonstração do funcionamento do equipamento, entre outros.

### 2.1.2. Manual

Para facilitar o processo de formação em vectores culicídeos foi distribuído aos formandos um Manual <sup>14</sup> preparado pelo CEVDI/INSA, com revisão bibliográfica sobre mosquitos e agentes transmitidos e descrição detalhada de metodologias no campo e no laboratório, assim como os protocolos e impressos a serem utilizados pelos técnicos REVIVE no trabalho que decorreria de Maio a Outubro.

## 2.2. Equipamentos e metodologias

### 2.2.1. Campo

Os programas que envolvem a investigação e vigilância de mosquitos estão normalmente focados no estudo das fases larvares, no entanto, os métodos de amostragem são diversos e não sistematizados, variando com os interesses, objectivos e oportunidades das equipas.

(14) Disponível para consulta na biblioteca do CEVDI / INSA.



Os métodos de colheita não podem ser universalmente aplicados a todas as espécies de mosquitos (as armadilhas com luz não colhem as espécies diurnas, o isco humano só colhe espécies antropofílicas e é muito difícil chegar aos refúgios de adultos). Por isso, a maioria dos investigadores prefere estádios imaturos – aquáticos – fáceis de localizar e realizar a colheita.

A amostragem ideal em programas de vigilância exaustivos e sem limitações de recursos humanos e financeiros implicaria, em ambientes aquáticos, colheitas realizadas por duas pessoas/hectare/dia, em ambientes naturais (depois de excluir áreas pobres em ambientes aquáticos, como campos de pastagem, dunas, zonas desertas, etc.) e, em ambientes urbanos, a divisão da região em quadrantes com um hectare e colheitas em um ponto seleccionado deste.

Para iniciar os trabalhos, no âmbito do REVIVE, foram seleccionadas as armadilhas tipo CDC iscadas com CO<sub>2</sub> (Figura 1) e aspiradores para captura de culicídeos vivos, para utilização na pesquisa de agentes infecciosos.

Figura 1: Armadilha tipo CDC para colheita de culicídeos adultos



Copyright: Hugo Obeiro

Na recolha de larvas e pupas em criadouros aquáticos, para uma identificação mais completa da distribuição de espécies, foram utilizados caços (Figura 2).

Figura 2: Caço para recolha de estádios imaturos de mosquitos em criadouros aquáticos



Copyright: Hugo Obeiro

A periodicidade da amostragem também pode ser muito variável de acordo com os objectivos. Em Portugal, o período mais significativo para a presença de mosquitos ocorre de Maio a Outubro, tendo sido essas as datas seleccionadas para as colheitas, não excluindo, no entanto, a probabilidade, cada vez maior, de ocorrência de mosquitos noutros períodos do ano devido às alterações climáticas.

No período de Maio a Outubro as ARS's foram aconselhadas a fazer saídas de duas ou três noites de colheita, duas vezes por mês.

### 2.2.2. Selecção de locais e calendário de colheitas

As selecções de locais e calendários de colheitas foram feitas pelas respectivas ARS's, que informaram o CEVDI/INSA antes das saídas de campo, para programação da chegada de material.



### 2.2.3. Envio de amostras para o laboratório

As amostras chegaram ao CEVDI/INSA por correio, ou em mão, acondicionadas em malas refrigeradas e até três dias depois do início do trabalho de campo.

### 2.2.4. Dados das colheitas

Todas as amostras chegaram acompanhadas dos respectivos Boletins de Colheita de Mosquitos Adultos e Estádios Imaturos, nos quais foram reunidas informações sobre ARS, colector, local de colheita, descrição, coordenadas GPS, condições atmosféricas, horas, temperatura e humidade.

## 2.3. Laboratório

### 2.3.1. Identificação de culicídeos

Os mosquitos recebidos no laboratório foram anestesiados num refrigerador a 4°C e identificados à espécie com as chaves de identificação de Ribeiro e Ramos (1999)<sup>15</sup> e Schaffner et al. (2001)<sup>16</sup>. Os mosquitos identificados foram transferidos para tubos em *pools* até um máximo de 50 espécimes, de acordo com a espécie, género, data e local de colheita.

### 2.3.2. Pesquisa de flavivírus

A vigilância de flavivírus é tipicamente efectuada testando a sua presença em espécies de mosquitos vectores. As taxas de prevalência derivadas são usadas para estimar o risco de transmissão a populações susceptíveis. Recentemente, têm sido desenvolvidas várias

abordagens baseadas em *Polymerase Chain Reaction* (PCR), como alternativa fiável e sensível para a detecção de ácidos nucleicos virais em *pools* de vectores e amostras de tecidos.

A extracção de RNA total foi efectuada a partir dos macerados de mosquitos em azoto líquido, recorrendo a um kit comercial (*Micro-to-Midi total RNA purification system*, Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi imediatamente processado para RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) ou armazenado a -80 °C até ser utilizado.

A detecção de RNA viral foi efectuada por reacções de RT-PCR, utilizando o kit *SuperScript™ One-Step RT-PCR* (Invitrogen), que permite a produção, num passo único, de cDNA viral a partir do RNA total extraído, seguida de amplificação por PCR, recorrendo a *primers* desenhados para regiões conservadas no gene codificante para a proteína NS5 em flavivírus.

De forma a aumentar a sensibilidade do método de detecção foi efectuada uma segunda reacção de amplificação por PCR utilizando o kit *High Fidelity PCR Master* (Roche). Todas as reacções de amplificação foram realizadas em simultâneo com um controlo positivo (RNA do vírus *West Nile*) e um controlo negativo (amostra sem adição de RNA), de forma a comprovar, respectivamente, a eficiência das reacções e a ausência de contaminação entre amostras.

Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose corados com brometo de etídeo ou GelRed, e a sua dimensão determinada por comparação com o controlo positivo e marcadores de peso molecular comerciais. Os produtos com a dimensão esperada para

(15) Ribeiro, H, Ramos, HC. Identification keys of the mosquitoes of Continental Portugal, Açores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, 1999; 3:1-11.

(16) Schaffner, E, Angel, G, Geoffroy, B, Hervy, J-P, et al. *The Mosquitoes of Europe: An identification and Training Programme*. IRD editions; 2001 (CD-ROM).



flavivírus, isto é, cerca de 200 pares de bases, foram purificados utilizando um kit de purificação de produtos PCR comercial (*Jet Quick-PCR Purification Kit*, Genomed) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados num sequenciador automático de capilares (*ABI automated DNA capillary sequencer*, Applied Biosystems, EUA).

As sequências nucleotídicas parciais para o gene NS5 determinadas foram analisadas e efectuaram-se pesquisas de semelhanças na base de dados do GenBank usando o algoritmo BLASTN <sup>17</sup>.

#### 2.4. Dados do REVIVE

O CEVDI/INSA criou bases de dados com todos os dados fornecidos pelas ARS's nos Boletins de Colheitas de Adultos e Estádios Imaturos, nomeadamente localidade, descrição do local, horário da colocação de armadilhas, temperaturas máxima e mínima, humidade relativa, coordenadas GPS, etc. A estes dados foram acrescentados os dados gerados no laboratório, como por exemplo o estado à chegada ao laboratório, identificação do estádio de desenvolvimento, género, espécie, infecção por flavivírus, entre outros.

O REVIVE tem gerado dados de qualidade que, devidamente processados, vão permitir entender a distribuição geográfica, a ecologia e o impacto das alterações ambientais no planeamento de estudos de vigilância e determinação de risco de doença. Os dados de georreferência serão importantes para a avaliação das determinantes ambientais na distribuição de mosquitos.

#### 2.5. Divulgação dos resultados

Em 2008 e em 2009 foram preparados pelo CEVDI/INSA, e enviados a cada uma das ARS's, relatórios com os resultados da região.

À DGS e ao INSA, também em 2008 e em 2009, foram enviados os relatórios com os dados cumulativos.

(17) Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-3402.

03

# \_resultados \_Revive 2008



[www.insa.pt](http://www.insa.pt)



Relatório Revive 2008 / 2009

Programa Nacional de  
Vigilância de Vectores Culicídeos

Em 2008, o trabalho de campo decorreu entre 1 de Junho e 29 de Outubro.

O laboratório identificou 18305 mosquitos adultos e 3340 em estádios imaturos.

Nas colheitas de culicídeos participaram as ARS's Alentejo, Algarve, Lisboa e vale do Tejo e Norte.

No total foram estudados 43 concelhos em 266 armadilhas/noite com utilização de armadilhas tipo CDC para captura de culicídeos adultos. Simultaneamente, foram realizadas 143 colheitas de estádios imaturos em 37 concelhos (Quadro 1; Figura 3).

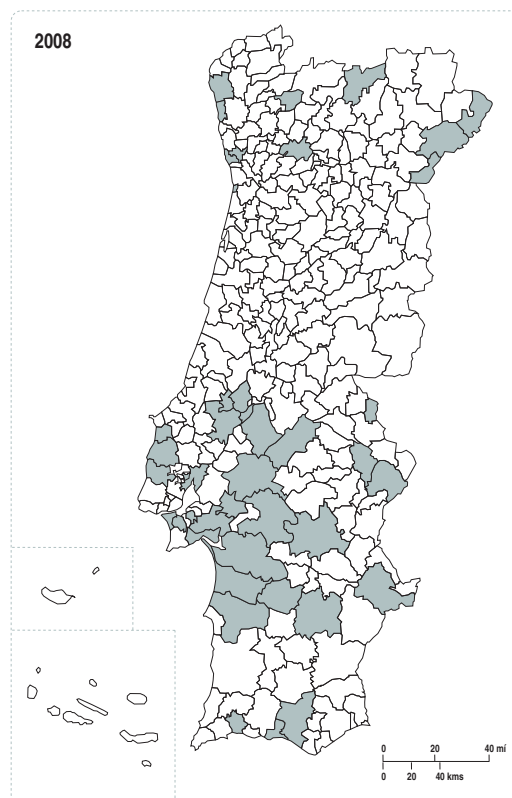
Os locais de amostragem foram seleccionados pelas ARS's, tendo como critério a proximidade à população humana, o historial da presença de mosquitos, o impacto nas actividades humanas e a presença de potenciais criadouros. O calendário de colheitas, também definido pelas ARS's, permitiu uma rotatividade periódica pelos locais de amostragem.



Quadro 1: *Resumo dos resultados das colheitas efectuadas em 2008*

Data início / fim	01-06-08 / 29-10-08
<b>Colheitas Adultos (Armadilhas / noite)</b>	<b>266</b>
Concelhos	43
Adultos capturados	18305
♀	17075
♂	1230
N.º de espécies	11
<b>Colheitas Larvas (boletins)</b>	<b>143</b>
Concelhos	37
Larvas capturadas	3340
N.º de espécies	9

Figura 3: *Concelhos de Portugal em que foram feitas colheitas de culicídeos em 2008*

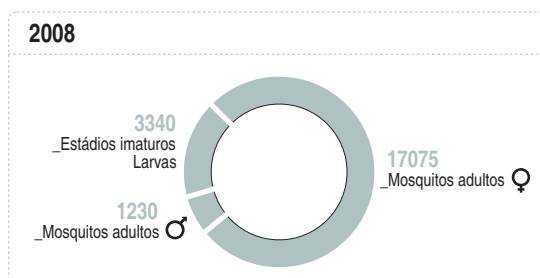


### 3.1. Colheitas de Culicídeos

Em 2008 foram colhidas 3340 larvas, 1230 mosquitos machos e 17075 fêmeas (Figura 4). O número elevado de fêmeas capturadas reflecte a técnica de colheita seleccionada, orientada para vectores, nomeadamente as armadilhas tipo CDC iscadas com CO<sub>2</sub>.

As sessões de trabalho de campo decorreram de Junho a Outubro (Quadro 2). Os meses de Junho e Julho foram os melhores em termos de totais de espécimes recolhidos e de sucesso de captura <sup>18</sup>.

Figura 4: Totais das colheitas efectuadas em 2008



Quadro 2: Número de colheitas, larvas e mosquitos adultos. Sucesso de captura por mês

	Larvas		Adultos		
	Colheitas	n	Colheitas	n	Sucesso de captura
<b>Junho</b>	19	299	29	4693	<b>162</b>
<b>Julho</b>	44	1071	71	5007	<b>71</b>
<b>Agosto</b>	32	402	59	1995	<b>34</b>
<b>Setembro</b>	28	884	54	3026	<b>56</b>
<b>Outubro</b>	20	684	53	3584	<b>68</b>

Por ARS (Quadro 3) notou-se um maior sucesso no Algarve, uma vez que os técnicos que realizaram os trabalhos de campo, ex-sezonáticos, contavam já com alguma experiência e tinham também realizado saídas de campo, em 2006 e 2007, no âmbito de um Protocolo de colaboração entre a ARS Algarve e o INSA para “Vigilância do vector do vírus do Nilo Ocidental”. Também foi decisivo para o sucesso de captura a opção da ARS de usar isco (CO<sub>2</sub>) em todas as sessões de armadilhagem.

Quadro 3: Número de colheitas, larvas e mosquitos adultos. Sucesso de captura por região

	Larvas		Adultos		
	Colheitas	n	Colheitas	n	Sucesso de captura
<b>Alentejo</b>	33	758	58	1919	<b>33</b>
<b>Algarve</b>	10	604	30	13499	<b>450</b>
<b>Centro</b>	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>LVT</b>	78	1850	137	2640	<b>19</b>
<b>Norte</b>	22	128	41	247	<b>6</b>

(18) Sucesso de captura = n.º de mosquitos adultos / (armadilhas / noite)



As ARS's realizaram colheitas de culicídeos em estádios imaturos e adultos em 37 e 45 concelhos, respectivamente (Quadro 4).

A utilização de CO<sub>2</sub> como isco foi constante no Algarve e Lisboa e vale do Tejo e intermitente no Alentejo e Norte.

Albufeira foi o concelho onde foram colhidos mais mosquitos adultos, e com maior sucesso de captura, e Grândola o concelho onde foram colhidos mais mosquitos em estádios imaturos.

Quadro 4: Amostragem de larvas e mosquitos adultos por concelho

Concelho	Larvas		Adultos		Sucesso de captura
	Colheita (boletins)	n	Colheita (armadilhas / noite)	n	
<b>ARS Alentejo</b>					
Alcácer do Sal	2	9	3	4	1
Beja	0	0	8	29	4
Elvas	6	0	8	155	19
Évora	3	162	4	188	47
Ferreira	0	0	4	1029	257
Marvão	3	126	5	24	5
Monforte	4	191	4	213	53
Montemor	2	54	3	75	25
Mora	4	72	4	4	1
Moura	0	0	6	12	2
Mourão	3	94	3	33	11
Ponte de Sor	6	50	6	153	26
<b>ARS Algarve</b>					
Albufeira	5	363	10	6268	627
Loulé	2	161	10	1495	150
Portimão	3	80	10	5736	574
<b>ARS Lisboa e Vale do Tejo</b>					
Alcácer	0	0	2	59	30
Alcanena	4	177	5	19	4
Almada	2	97	5	31	6
Chamusca	2	0	1	58	58
Coruche	3	27	6	179	30
Golegã	2	100	3	63	21
Grândola	12	643	3	49	16
Lourinhã	7	124	15	521	35
Mafra	9	304	13	298	23
Moita	1	5	5	173	35
Montijo	3	79	9	292	32
Palmela	8	191	9	71	8
Santarém	2	0	6	103	17
S. do Cacém	1	2	9	108	12
Seixal	4	13	9	57	6
Setúbal	0	0	9	77	9
Torres Novas	0	0	1	43	43
Torres Vedras	3	0	12	78	7
V. F. de Xira	15	88	15	361	24



Quadro 4: Cont.

Concelho	Larvas		Adultos		Sucesso de captura
	Colheitas (boletins)	n	Colheitas (armadilhas / noite)	n	
<b>ARS Norte</b>					
Amarante	1	0	3	0	0
Chaves	2	0	5	39	8
Darque	7	79	7	9	1
Espinho	1	0	1	0	0
Esposende	0	0	4	6	2
F. Espada à Cinta	1	12	2	0	0
Maia	4	37	5	102	20
Matosinhos	2	0	5	69	14
Miranda do Douro	2	0	4	19	5
Mogadouro	2	0	1	0	0
Vieira Minho	0	0	4	3	1

### 3.2. Identificação de culicídeos

NO CEVDI/INSA foram identificadas, no total, 14 espécies de culicídeos colhidos em Portugal continental, destas nove espécies em estádios imaturos e 11 em adultos (Quadro 5).

Durante o estudo de identificação de culicídeos foi dada uma atenção permanente à possibilidade de serem detectadas espécies exóticas ou não referenciadas na fauna de culicídeos portugueses.

Quadro 5: Espécies, estádios, número de mosquitos capturados e abundância

	Larvas	Adultos		Total	Abundância % <sup>19</sup>
		♂	♀		
<i>Anopheles algeriensis</i>	0	6	405	411	1,899
<i>An. atroparvus</i>	4	12	48	64	0,296
<i>An. claviger</i>	0	0	2	2	0,009
<i>Culiseta annulata</i>	0	3	47	50	0,231
<i>Cs. longiareolata</i>	1258	94	63	1415	6,537
<i>Culex hortensis</i>	40	0	0	40	0,185
<i>Cx. laticinctus</i>	295	0	0	295	1,363
<i>Cx. perexiguus</i>	66	25	181	272	1,257
<i>Cx. pipiens</i>	1651	672	6220	8543	39,469
<i>Cx. theileri</i>	22	255	3981	4258	19,672
<i>Culex sp.</i>	3	0	0	3	0,014
<i>Ochlerotatus caspius</i>	0	141	6043	6184	28,570
<i>Oc. detritus</i>	0	10	59	69	0,319
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1	12	26	39	0,180
<b>Total</b>	<b>3340</b>	<b>1230</b>	<b>17075</b>	<b>21645</b>	<b>100,000</b>

(19) Abundância (%) = n.º de mosquitos de uma espécie / n.º total de mosquitos colhidos.



---

As espécies mais capturadas nos estádios imaturos foram *Culex laticinctus*, *Cx. pipiens* e *Culiseta longiareolata*. Em adultos, as espécies mais abundantes foram *Cx. pipiens*, *Ochlerotatus caspius* e *Cx. theileri*.

Nesta amostragem não foram detectadas introduções de espécies exóticas/invasoras, tais como *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Ae. (Stegomyia) albopictus*.

Em relação à distribuição mensal (Quadro 6) verificou-se que, nos estádios imaturos, *Culiseta longiareolata* foi a espécie mais capturada em Junho e Julho, e *Culex pipiens* nos restantes meses.

Nos adultos *Cx. theileri* foi a espécie mais abundante em Junho e, no resto da época, *Ochlerotatus caspius* (Julho e Outubro) e *Culex pipiens* (Agosto e Setembro).

---



Quadro 6: ↓ Espécies e estádios de mosquito colhidos por mês no período da amostragem

2008 Espécie	Junho		Julho		Agosto		Setembro		Outubro		Total
	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	
<i>Anopheles algeriensis</i>	0	6 326	0	0 53	0	0 5	0	0 21	0	0 0	441
<i>An. claviger</i> s.l.	0	0 0	0	0 0	0	0 1	0	0 0	0	0 1	2
<i>An. maculipennis</i> s.l.	0	8 13	40	3 12	0	0 3	0	0 10	0	1 10	100
<i>Culiseta annulata</i>	0	3 24	0	0 11	0	0 2	0	0 5	0	0 5	50
<i>Cs. longiareolata</i>	189	11 14	526	23 11	68	16 7	359	16 8	116	28 23	1415
<i>Culex hortensis</i>	0	0 0	40	0 0	0	0 0	0	0 0	0	0 0	40
<i>Cx. latincinctus</i>	0	0 0	0	0 0	125	0 0	20	0 0	150	0 0	295
<i>Cx. perexiguus</i>	1	6 5	15	7 29	0	3 69	0	8 67	50	1 11	272
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	99	206 954	486	79 1854	208	261 829	494	86 2064	367	40 519	8546
<i>Cx. theileri</i>	10	221 2212	0	12 735	1	19 312	11	2 327	0	0 395	4257
<i>Ochlerotatus caspius</i>	0	1 652	0	96 2062	0	20 445	0	4 397	0	20 2488	6185
<i>Oc. detritus</i>	0	0 18	0	0 0	0	0 3	0	0 6	0	10 32	69
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	0	2 11	0	10 10	0	0 0	0	0 5	1	0 0	39
<b>Total</b>	299	464 4229	1071	230 4777	402	319 1676	884	116 2910	684	100 3484	21645
<b>Total/mês</b>		4992		6078		2397		3910		4268	



### 3.3. Dados ecológicos

As ARS's, em 2008, realizaram sessões de colheitas de mosquitos adultos em 22 habitats diferentes (Quadro 7).

Em 73% das sessões foi utilizado como atractivo para os mosquitos fêmea o CO<sub>2</sub> na forma de gelo seco.

O sucesso de captura foi maior nas lagoas e sapais.

A maior diversidade de espécies foi detectada nos sapais e parques naturais.

Quadro 7: Número de colheitas, adultos e espécies. Sucesso de captura e espécie mais abundante por habitat em 2008

Habitat Adultos	Colheitas Totais	Colheitas com CO <sub>2</sub>	Adultos	Sucesso captura	Espécies	Espécie mais abundante
Aeroporto	1	1	1	1	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Albufeira	3	0	29	10	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Arrozal	4	0	62	16	5	<i>Cx. perexiguus</i> s.l.
Aterro sanitário	2	1	6	3	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Barragem	10	4	1081	108	7	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Campo de Golf	1	1	11	11	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Canil	3	3	137	46	2	<i>Oc. caspius</i>
Cemitério	6	6	81	14	3	<i>Oc. caspius</i>
Centro hípico	3	3	13	4	3	<i>Cs. longiareolata</i>
Centro Recuperação Aves	7	3	106	15	8	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
ETAR	26	14	378	15	4	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Jardim zoológico	2	15	15	8	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Lagoa	12	10	6270	523	8	<i>Cx. theileri</i>
Parque de campismo	10	5	39	4	5	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Parque natural	13	11	1503	116	9	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Parque urbano	12	8	307	26	5	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Porto marítimo	12	10	78	7	4	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Praia	6	3	84	14	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Quinta	55	36	1006	18	8	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Rio	24	17	213	9	3	<i>Cx. theileri</i>
Sapal	11	10	5740	522	10	<i>Oc. caspius</i>
Urbano	43	34	1014	24	8	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
<b>Total</b>	<b>266</b>	<b>195</b>	<b>18174</b>			



Os estádios imaturos foram colhidos em 17 tipos de criadouros aquáticos (Quadro 8).

Os pequenos contentores, recipientes abandonados, vasos nos cemitérios ou pequenas poças criadas pela água de chuva em terrenos irregulares, e as estações de tratamento de águas residuais (ETAR) foram os criadouros onde foram detectadas maiores abundâncias de larvas. A maior diversidade de espécies foi também observada nos pequenos contentores.

Quadro 8: Colheitas, número total de larvas e espécies colhidas por tipo de habitat / criadouro

Habitat Larvas	Colheitas	Larvas	Espécies	Espécie mais abundante
Arrozal	2	9	1	<i>Culiseta longiareolata</i>
Barragem	5	70	2	<i>Cs. longiareolata</i>
Cais comercial	7	79	2	<i>Cs. longiareolata</i>
ETAR	13	660	4	<i>Culex pipiens</i> s.l.
Jardim zoológico	2	37	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Lago	3	16	1	<i>Cs. longiareolata</i>
Lago (urbano)	10	250	2	<i>Cs. longiareolata</i>
Lagoa	6	268	5	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Linha de água (urbano)	8	387	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Mata Choupal	1	0	0	-
Médios contentores	5	114	2	<i>Cs. longiareolata</i>
Pequenos contentores	46	822	6	<i>Cs. longiareolata</i>
Praia fluvial	3	142	2	<i>Cs. longiareolata</i>
Rio	6	0	0	-
Sapal	1	50	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Tanque de rega	17	360	4	<i>Cx. laticinctus</i>
Vala	8	76	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.

### 3.4. Pesquisa de flavivírus

#### 3.4.1. Pools

No laboratório foram processados para pesquisa de flavivírus os mosquitos fêmeas que chegavam vivos, uma vez que os flavivírus são vírus com genoma de RNA e o sucesso da detecção/isolamento fica comprometido se não se verificarem estas condições. As fêmeas ingurgitadas (com refeição de sangue recente) foram descartadas, uma vez que o seu papel como vector não seria conclusivo.

Os mosquitos capturados no mesmo dia e local foram identificados à espécie e agrupados em *pools* até um máximo de cerca de 50 indivíduos, posteriormente macerados em azoto líquido.

Para cada uma das regiões o laboratório preparou *pools* de modo a que houvesse representação de todas as espécies, meses de colheita e região.

Por região, foram estudadas em *pools* entre 32 e 76% do total das fêmeas recebidas (Quadro 9).

Quadro 9: Número de *pools* e de mosquitos fêmeas processados por região

	Total ♀	♀ em <i>pools</i>	<i>Pools</i>	% ♀ em <i>pools</i>
Alentejo	1666	826	32	50 %
Algarve	12887	4061	105	32 %
Centro	0	0	0	0 %
LVT	2323	1766	71	76 %
Norte	199	132	6	66 %
<b>Total</b>	<b>17075</b>	<b>6785</b>	<b>214</b>	<b>40 %</b>

No Quadro 10 é apresentada a distribuição dos *pools* preparados para cada um dos concelhos estudados. Nem todos os concelhos onde foram realizadas colheitas estão representados devido à deficiente qualidade da amostra à chegada ao laboratório.

Quadro 10: Número de *pools* e de mosquitos processados por ARS e por concelho em 2008

Concelho	Mosquitos ♀	<i>pools</i>
<b>ARS Alentejo</b>		
Beja	11	2
Elvas	86	3
Évora	33	1
Ferreira	376	8
Monforte	153	6
Montemor	43	3
Mourão	15	2
Ponte de Sor	109	7
<b>ARS Algarve</b>		
Albufeira	1855	45
Loulé	590	17
Portimão	1616	43
<b>ARS Lisboa e Vale do Tejo</b>		
Alcácer do Sal	50	2
Alcanena	6	1
Almada	28	2
Chamusca	56	3
Coruche	137	7
Golegã	47	2
Grândola	24	1
Lourinhã	413	11
Mafra	162	4
Moita	0	0
Montijo	237	11
Palmela	42	4
Santarém	75	2
Santiago Cacém	53	3
Seixal	47	2



Quadro 10: Cont.

Concelho	Mosquitos ♀	pools
<b>ARS Lisboa e Vale do Tejo</b>		
Setúbal	31	3
Torres Novas	26	1
Torres Vedras	56	3
Vila Franca Xira	276	9
<b>ARS Norte</b>		
Amarante	0	0
Chaves	11	1
Darque	0	0
Espinho	0	0
Esposende	0	0
F. Espada Cinta	0	0
Maia	91	4
Matosinhos	30	1
M. do Douro	0	0
Mogadouro	0	0
V. do Minho	0	0
<b>Total</b>	<b>6785</b>	<b>214</b>

Na preparação dos *pools* foi dada uma atenção especial para que houvesse distribuição representativa das espécies colhidas (Quadro 11), assim como do período em que essa colheita se realizou (Quadro 12).

As três espécies mais abundantes foram também as mais representadas nos *pools*. *Anopheles claviger* e *Uranotenia unguiculata* uma vez que só foram colhidos, respectivamente, dois e 26 mosquitos fêmeas não foram representadas.

Quadro 11: Número de *pools* e de mosquitos processados por espécie

Espécie	Mosquitos ♀	Pools
<i>Anopheles algeriensis</i>	278	7
<i>An. atroparvus</i>	15	4
<i>Culiseta annulata</i>	1	1
<i>Cs. longiareolata</i>	5	2
<i>Culex perexiguus</i>	114	8
<i>Cx. pipiens</i>	3493	107
<i>Cx. theileri</i>	1353	40
<i>Ochlerotatus caspius</i>	1524	44
<i>Oc. detritus</i>	2	1



Na distribuição de *pools* por mês de colheita, em Setembro foram estudados mais mosquitos uma vez que, apesar de não ter sido o mês em que, no conjunto, se capturaram mais mosquitos, foi o mês em que a espécie mais abundante, *Culex pipiens*, esteve mais representada (2064 fêmeas). Esta espécie de mosquito é o vector preferencial de vírus *West Nile*, por essa razão o laboratório insistiu na identificação de flavivírus.

Quadro 12: Número de *pools* e de mosquitos processados por data.

Mês	Mosquitos ♀	Pools
Junho	1729	36
Julho	1143	32
Agosto	1387	41
Setembro	2087	76
Outubro	439	29

### 3.4.2. Flavivírus

As amostras positivas por PCR, com amplificação positiva de um fragmento específico de cerca de 200 pares de bases, e, conseqüentemente, suspeitas para a presença de flavivírus, foram sequenciadas directamente, ou após clonagem, para tentativa de identificação molecular da eventual presença de flavivírus, nomeadamente do vírus *West Nile*, por pesquisa de sequências semelhantes em bases de dados internacionais (GenBank).

A presença de RNA viral foi confirmada em quatro *pools*.

Os fragmentos obtidos por PCR foram purificados, sequenciados e as sequências analisadas por pesquisa de semelhanças em bases de dados (GenBank), permitindo a identificação molecular de sequência semelhante a:

\_Um flavivírus (Wang Thong) em três *pools* de *Cx. theileri* colhidos no concelho de Albufeira (Lagoa dos Salgados) em 27 de Junho de 2008;

no concelho de Vila Franca de Xira (Vala do Carregado) e Coruche respectivamente, a 16 e 24 de Julho de 2008;

\_Um flavivírus isolado de mosquitos do género *Culex* (Tokyo) em um *pool* de *Oc. caspius* capturado no concelho de Albufeira (Lagoa dos Salgados) em 18 de Setembro de 2008.

A Taxa Mínima de Infecção (MIR)<sup>20</sup> determinada para estes flavivírus foi de 2,2 para *Culex theileri*, 0,7 para *Ochlerotatus caspius* e 0,0 para as outras espécies.

Assume-se que se o valor de MIR for igual a zero não existe actividade viral, valores até quatro revelam alguma actividade e valores superiores a quatro tornam necessária a tomada de medidas de controlo.

Salienta-se, no entanto, que apesar dos valores de MIR serem baixos, nenhum dos flavivírus detectados molecularmente é referido como patogénico para o Homem.

(20) Taxa Mínima de Infecção (MIR) = (n.º de *pools* positivos / n.º total de mosquitos testados) x 1000.



### 3.5. Conclusões

Os resultados do primeiro ano do programa REVIVE contribuíram para um conhecimento mais sistemático da fauna de culicídeos no território do continente, assim como do seu potencial papel de vector.

As ARS's foram apetrechadas com equipamento para colheitas de culicídeos em vários estádios de desenvolvimento.

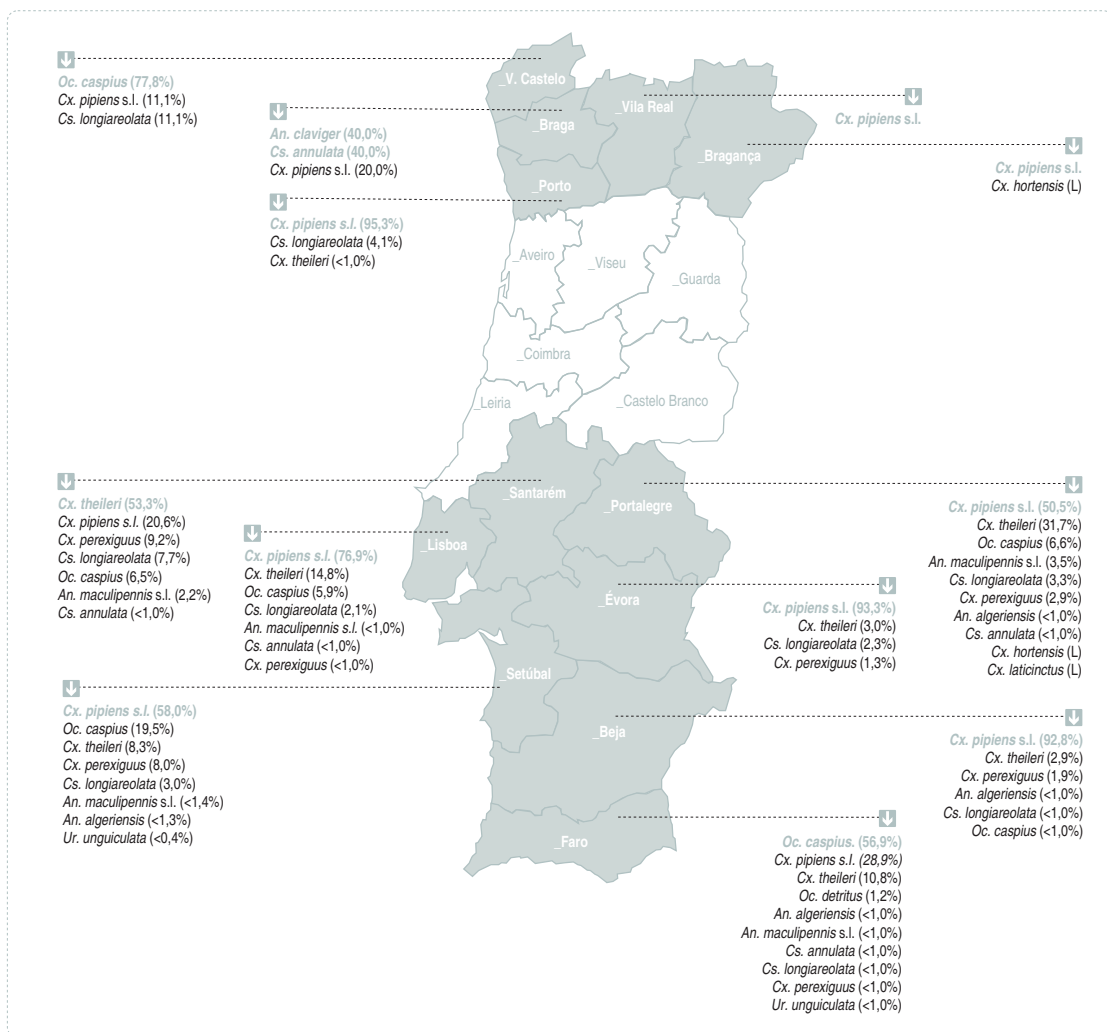
Foram criadas condições para a formação de técnicos de saúde ambiental em vigilância de mosquitos.

Foram criados mapas de distribuição de culicídeos com a respectiva abundância relativa (Figura 5).

O potencial vector das espécies colhidas foi testado laboratorialmente, tendo sido detectados flavivírus.

Não foram detectadas espécies exóticas/invasoras nas amostras enviadas ao laboratório.

Figura 5: Mapa de distribuição de espécies de culicídeos em Portugal continental. REVIVE 2008





www.insa.pt



*Relatório Revive 2008 / 2009*  
Programa Nacional de  
Vigilância de Vectores Culicídeos

04

# \_resultados \_Revive 2009



[www.insa.pt](http://www.insa.pt)



Relatório Revive 2008 / 2009

Programa Nacional de  
Vigilância de Vectores Culicídeos

O trabalho de campo realizado pelas Administrações Regionais de Saúde (ARS's), para a recolha de mosquitos adultos e estádios imaturos, decorreu entre 4 de Maio e 22 de Outubro de 2009.

Nas colheitas de culicídeos, em 2009, participaram a ARS Alentejo, Algarve, Centro e Norte.

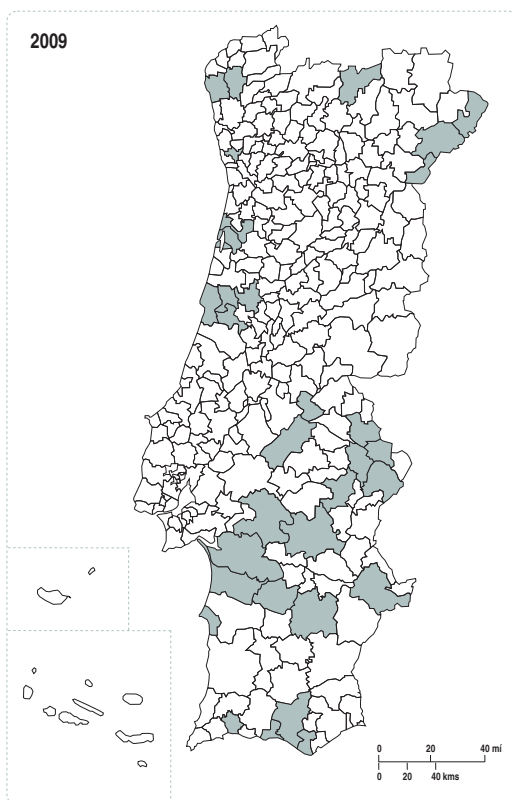
No total foram estudados 31 concelhos em 227 armadilhas/noite com utilização de armadilhas tipo CDC para colheita de adultos.

Simultaneamente foram realizadas 59 colheitas de larvas em 23 concelhos (Quadro 13, Figura 6).

Os locais de amostragem foram seleccionados pelas ARS's, tendo como critério a proximidade à população humana, o historial da presença de mosquitos, o impacto nas actividades humanas e a presença de potenciais criadouros. O calendário de colheitas, também definido pelas ARS's, permitiu uma rotatividade periódica pelos locais de amostragem.

Quadro 13: ↓ *Resumo dos resultados da amostragem*

Data início / fim	04-05-09 / 22-10-09
<b>Colheitas Adultos (Armadilhas / noite)</b>	<b>227</b>
Concelhos	31
Adultos capturados	23336
♀	21899
♂	1437
N.º de espécies	13
<b>Colheitas Larvas (boletins)</b>	<b>59</b>
Concelhos	23
Larvas capturadas	2397
N.º de espécies	8

Figura 6: ↓ *Concelhos de Portugal em que foram feitas colheitas de culicídeos em 2009*

O laboratório identificou mosquitos adultos, de acordo com as ARS's, em 62 a 100% das amostras enviadas. Em relação ao envio de estádios imaturos, o laboratório identificou larvas de culicídeos, também de acordo com a proveniência, em 0 a 83% das amostras recebidas. Foram identificadas 13 espécies na amostragem total de 23336 adultos e oito espécies em 2397 larvas.



#### 4.1. Colheitas de culicídeos

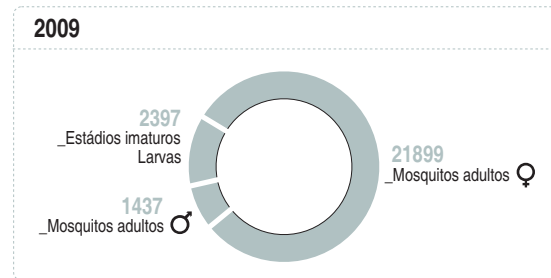
No total foram colhidas 2397 larvas e 23336 mosquitos adultos, destes 1437 machos e 21899 fêmeas (Figura 7). O número mais elevado de fêmeas capturadas é resultado da técnica de colheita seleccionada, orientada para vectores, nomeadamente as armadilhas tipo CDC.

As ARS's utilizaram, em 61,7% das colheitas de adultos, CO<sub>2</sub>, na forma de gelo seco, como atractivo para os mosquitos fêmeas.

As larvas foram colhidas de vários tipos de criadouros aquáticos, tendo sido utilizados colectores como caços e outros utensílios, de acordo com a facilidade e eficiência na colheita dos estádios imaturos.

A distribuição mensal das colheitas de larvas e adultos, assim como o sucesso de captura <sup>21</sup> por mês, são apresentados no Quadro 14.

Figura 7: Totais das colheitas efectuadas em 2009



O sucesso de captura e o número de mosquitos capturados foi maior nos meses de Junho, Agosto e Setembro.

Em Maio não foram efectuadas colheitas de larvas por nenhuma das ARS's.

Quadro 14: Número de colheitas, larvas e mosquitos adultos. Sucesso de captura por mês

	Larvas		Adultos		
	Colheitas	n	Colheitas	n	Sucesso de captura
Maio	0	0	18	101	6
Junho	7	210	32	5313	166
Julho	17	831	52	2450	47
Agosto	16	400	48	8403	175
Setembro	16	765	48	6599	137
Outubro	3	191	29	470	16

O número de armadilhas/noite e de colheitas de larvas, representadas por boletins recebidos no laboratório, efectuadas por ARS, assim como o sucesso de captura, estão representadas no Quadro 15.

As ARS Alentejo e Algarve colheram o maior número de larvas e mosquitos adultos, respectivamente. O maior esforço de captura foi feito pela ARS Centro.

A ARS Algarve foi mais eficiente nas armadilhas/noite, com um sucesso de captura de 228 mosquitos por armadilha em média.

(21) Sucesso de captura = n.º de mosquitos adultos / (armadilhas / noite)



Quadro 15: Número de colheitas, larvas e mosquitos adultos. Sucesso de captura por região

	Larvas		Adultos		
	Colheitas	n	Colheitas	n	Sucesso de captura
Alentejo	29	2100	60	9975	166
Algarve	6	173	45	10249	228
Centro	10	0	105	3004	29
LVT	0	0	0	0	0
Norte	14	124	17	108	6
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>2397</b>	<b>227</b>	<b>23336</b>	<b>103</b>

As ARS's realizaram amostragens de culicídeos dos estádios imaturos e de adultos em 23 e 31 concelhos de Portugal continental, respectivamente (Quadro 16).

Alcácer do Sal foi o concelho onde foram colhidos mais mosquitos adultos, e com maior sucesso de captura e Évora o concelho onde foram colhidos mais espécimes em estádios imaturos; ambos os concelhos pertencem à região do Alentejo.

Quadro 16: Amostragem de larvas e mosquitos adultos por concelho

Concelho	Larvas		Adultos		Sucesso de captura
	Colheitas (boletins)	n	Colheitas (armadilhas / noite)	n	
<b>ARS Alentejo</b>					
Alcácer do Sal	4	15	6	5537	923
Arronches	1	165	0	0	-
Beja	0	0	4	137	34
Elvas	4	200	4	242	61
Estremoz	1	0	4	1645	411
Évora	4	900	6	348	58
Ferreira	0	0	6	673	112
Gavião	2	126	4	13	3
Grândola	1	50	3	264	88
Monforte	2	60	6	191	32
Montemor	2	35	2	337	169
Moura	0	0	5	8	2
Mourão	1	100	2	479	240
Ponte de Sor	3	229	2	12	6
Portalegre	4	220	0	0	-
Sines	0	0	6	89	15
<b>ARS Algarve</b>					
Albufeira	4	109	9	4201	467
Faro	0	0	10	507	51



Quadro 16: Cont.

Concelho	Larvas		Adultos		Sucesso de captura
	Colheitas (boletins)	n	Colheitas (armadilhas / noite)	n	
<b>ARS Algarve</b>					
Loulé	2	64	10	778	78
Portimão	0	0	16	4743	296
<b>ARS Centro</b>					
Aveiro	-	-	18	25	1
Coimbra	3	0	17	75	4
Figueira da Foz	4	0	17	2560	151
Ílhavo	-	-	18	27	2
Montemor-o-Velho	3	0	14	87	6
Murteira	-	-	18	28	2
Soure	-	-	3	202	67
<b>ARS Norte</b>					
Chaves	4	0	5	8	2
F. Espada à Cinta	2	22	2	8	4
Maia	1	23	4	87	22
Miranda do Douro	2	0	2	0	0
Mogadouro	1	0	2	4	2
Ponte de Lima	-	-	2	1	1
Viana do Castelo	4	79	-	-	-

#### 4.2. Identificação de culicídeos

No CEVDI/INSA foram identificadas, em 2009, 16 espécies de culicídeos colhidos em Portugal continental.

No total da amostragem, determinou-se que as espécies com abundâncias <sup>22</sup> superiores foram *Culex pipiens s.l.*, *Ochlerotatus caspius* e *Cx. theileri*. As duas espécies, colhidas em estádios imaturos, mais abundantes foram *Cx. pipiens* e *Culiseta longiareolata* (Quadro 17).

Durante o estudo de identificação de culicídeos foi dada uma atenção permanente à possibilidade de serem detectadas espécies não referenciadas na fauna de culicídeos de Portugal.

Nesta amostragem não foram detectadas introduções de espécies exóticas/invasoras tais como *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Ae. (Stegomyia) albopictus*.

(22) Abundância (%) = (n.º de mosquitos de uma espécie / n.º total mosquitos escolhidos) x 100



Quadro 17: Espécies, estádios, número de mosquitos capturados e abundância

	Larvas	Adultos		Total	Abundância %
		♂	♀		
<i>Anopheles algeriensis</i>	0	0	8	8	0,03
<i>An. claviger</i> s.l.	0	6	25	31	0,12
<i>An. maculipennis</i> s.l.	8	25	94	127	0,49
<i>An. plumbeus</i>	0	0	3	3	0,01
<i>Coquilletidea richiardii</i>	0	0	16	16	0,06
<i>Culiseta annulata</i>	3	0	24	27	0,10
<i>Cs. longiareolata</i>	779	59	28	866	3,37
<i>Culex hortensis</i>	3	0	0	3	0,01
<i>Cx. impudicus/territans</i>	14	0	0	14	0,05
<i>Cx. perexiguus</i>	0	6	163	169	0,66
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	1579	1096	7359	10034	38,99
<i>Cx. theileri</i>	2	49	5485	5536	21,51
<i>Cx. torrentium</i>	9	0	0	9	0,06
<i>Ochlerotatus caspius</i>	0	194	8549	8743	33,98
<i>Oc. detritus</i>	0	0	144	144	0,56
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	0	1	2	3	0,01
<b>Total</b>	<b>2397</b>	<b>1437</b>	<b>21899</b>	<b>25733</b>	<b>100,00</b>

Em relação à distribuição das espécies ao longo de toda a época de colheita, verificou-se que Agosto e Setembro foram os meses em que foram colhidos mais culicídeos (Quadro 18).

Quadro 18: ↓ Espécies de mosquitos detectadas por mês no período da amostragem

2009 Espécie	Maio		Junho		Julho		Agosto		Setembro		Outubro		Total
	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	Larvas	Adultos ♂ ♀	
<i>Anopheles algeriensis</i>	0	0 0	0	0 2	0	0 5	0	0 1	0	0 0	0	0 0	8
<i>An. claviger</i> s.l.	0	2 0	0	0 0	0	0 0	0	0 0	0	4 23	0	0 0	31
<i>An. maculipennis</i> s.l.	0	0 0	0	20 54	0	0 14	8	5 10	0	0 8	0	0 8	127
<i>An. plumbeus</i>	0	0 0	0	0 0	0	0 1	0	0 2	0	0 0	0	0 0	3
<i>Coquilletidea richiardii</i>	0	0 0	0	0 4	0	0 0	0	0 7	0	0 4	0	0 1	16
<i>Culiseta annulata</i>	0	0 3	0	0 6	3	0 2	0	0 0	0	0 11	0	0 2	27
<i>Cs. longiareolata</i>	0	0 0	35	0 3	200	44 16	311	11 4	215	2 3	18	2 2	866
<i>Culex hortensis</i>	0	0 0	2	0 0	0	0 0	0	0 0	1	0 0	0	0 0	3
<i>Cx. impudicus/terrigans</i>	0	0 0	0	0 0	1	0 0	13	0 0	0	0 0	0	0 0	14
<i>Cx. perexiguus</i>	0	0 0	0	0 0	0	1 7	0	4 113	0	2 34	0	0 8	169
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	0	1 11	173	464 2214	625	209 1900	68	264 1864	540	118 1051	173	40 319	10034
<i>Cx. theileri</i>	0	0 0	0	30 1803	2	2 118	0	14 2354	0	3 1155	0	0 55	5536
<i>Cx. torrentium</i>	0	0 0	0	0 0	0	0 0	0	0 0	9	0 0	0	0 0	9
<i>Ochlerotatus caspius</i>	0	0 62	0	131 569	0	0 91	0	23 3627	0	37 4139	0	1 23	8703
<i>Oc. detritus</i>	0	0 20	0	0 11	0	2 38	0	0 100	0	0 5	0	0 8	184
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	0	0 0	0	0 2	0	0 0	0	0 0	0	0 0	0	1 0	3
<b>Total</b>	0	3 98	210 645 4668	5523	831 258 2192	3281	400 321 8082	765 166 6433	191 44 426	661	25733		



### 4.3. Dados ecológicos

As ARS's realizaram sessões de colheitas de mosquitos adultos em 18 habitats diferentes (Quadro 19).

Em 62% das sessões foi utilizado como atractivo para os mosquitos fêmea o CO<sub>2</sub> na forma de gelo seco.

O sucesso de captura foi maior nas rias, nomeadamente Formosa e Alvor.

A maior diversidade de espécies foi detectada em lagoas, seguida das rias.

Rias e lagoas são muito importantes como habitat de culicídeos uma vez que, sobretudo as estudadas no âmbito do REVIVE, são santuários de aves migratórias e estas podem ser reservatórios de flavivírus, nomeadamente do vírus *West Nile*.

Quadro 19: Número de colheitas, adultos e espécies. Sucesso de captura e espécie mais abundante por habitat em 2009

Habitat Adultos	Colheitas Totais	Colheitas com CO <sub>2</sub>	Adultos	Sucesso captura	Espécies	Espécie mais abundante
Aeroporto	10	10	527	105	8	<i>Culex pipiens</i> s.l.
Albufeira	2	0	0	0	-	-
Arrozal	7	4	247	35	4	<i>Cx pipiens</i> s.l.
Barragem	13	12	1160	89	7	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
ETAR	11	10	991	90	5	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Jardim Zoológico	1	0	17	17	2	<i>Culiseta longiareolata</i>
Lagoa	15	15	4344	67	13	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Mata Choupal	17	5	75	4	7	<i>Anopheles claviger</i> s.l.
Parque urbano	1	0	6	6	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Paul	6	4	4	1	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Porto marítimo	34	20	2522	74	5	<i>Ochlerotatus caspius</i>
Praia fluvial	6	2	21	3	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Quinta	27	5	484	18	6	<i>Oc. caspius</i>
Reserva Natural	8	3	14	2	5	<i>Oc. detritus</i>
Ria	18	18	5476	304	9	<i>Oc. caspius</i>
Rio	3	0	4	1	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Salina	6	0	32	5	4	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Urbano	42	32	7412	177	8	<i>Cx. theileri</i>
<b>Total</b>	<b>227</b>	<b>140</b>	<b>23336</b>	<b>103</b>	<b>13</b>	



Relativamente às colheitas de larvas foram definidos 15 tipos de habitat (Quadro 20).

A maior diversidade de espécies foi detectada nos cais comerciais e praias fluviais.

O maior número de larvas foi colhido em linhas de água em ambiente urbano.

Quadro 20: Colheitas, número total de larvas e espécies colhidas por tipo de habitat / criadouro

Habitat Larvas	Colheitas	Larvas	Espécies	Espécie mais abundante
Arrozal	4	15	3	<i>Culiseta longiareolata</i>
Cais comercial	4	79	4	<i>Culex pipiens</i> s.l.
ETAR	1	18	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Jardim zoológico	1	23	2	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Lago	2	0	-	-
Lago (urbano)	6	220	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Lagoa	7	155	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Linha de água (urbano)	4	900	1	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Mata Choupal	3	0	-	-
Médios contentores	3	129	2	<i>Cs. longiareolata</i>
Pequenos contentores	10	710	2	<i>Cs. longiareolata</i>
Praia fluvial	5	148	4	<i>Cx. pipiens</i> s.l.
Rio	2	0	-	-
Tanque de rega	5	0	-	-
Vala	2	0	-	-
<b>Totais</b>	<b>59</b>	<b>2397</b>	<b>8</b>	

#### 4.4. Amostragem em Portos e Aeroportos

Face à importância da amostragem de culicídeos em portos marítimos e aeroportos, pela possibilidade de importação de mosquitos de outras regiões geográficas, e no seguimento das decisões tomadas para o 2.º ano do REVIVE, as ARS's do Algarve e Centro incrementaram a amostragem realizada nestes locais, nomeadamente no aeroporto de Faro e no porto marítimo de Portimão, Figueira da Foz, Ílhavo e Aveiro (Quadro 21).

No total foram colhidos mosquitos adultos em 34 armadilhas/noite nos portos e dez armadilhas/noite

no aeroporto de Faro, com 2522 espécimes colhidos em portos e 527 espécimes no aeroporto.

No aeroporto de Faro foram identificadas 8 espécies de mosquitos. Este aeroporto está localizado muito próximo de um importante parque natural, nomeadamente a Ria Formosa, que é, em determinadas zonas, santuário de aves migratórias (importantes para a introdução de flavivirus). Nos portos marítimos foram identificadas quatro espécies no Algarve e três na região centro.



Quadro 21: Espécie de culicídeos identificados em portos e aeroportos

Espécie	Portos				Aeroporto
	Aveiro	Fig. da Foz	Ílhavo	Portimão	Faro
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	V				V
<i>Culiseta longiareolata</i>		V	V	V	V
<i>Culex perexiguus</i>					V
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	V	V	V	V	V
<i>Cx. theileri</i>				V	V
<i>Ochlerotatus caspius</i>	V	V	V	V	V
<i>Oc. detritus</i>					V
<i>Uranotaenia unguiculata</i>					V

Nestes locais e amostragem não foram identificadas espécies exóticas/ invasoras tais como *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*.

#### 4.5. Pesquisa de flavivírus

No CEVDI/INSA foram processados, para pesquisa de flavivírus, os mosquitos fêmeas que chegavam vivos, uma vez que os flavivírus são vírus com genoma de RNA e o sucesso da detecção/isolamento fica comprometido em caso de deterioração das amostras. As fêmeas ingurgitadas (com refeição de sangue recente) foram descartadas, uma vez que o estudo do seu papel como vector não seria conclusivo.

Os mosquitos capturados no mesmo dia e local foram identificados à espécie e agrupados em *pools* até um máximo de cerca de 50 indivíduos, posteriormente macerados em azoto líquido e, de imediato, metade de cada macerado foi processado para extração de RNA. O volume restante de cada macerado foi armazenado a -80°C para posterior tentativa de isolamento de vírus, em caso de detecção de flavivírus por PCR.

Na preparação dos *pools* foi dada uma atenção especial para que a distribuição fosse representativa das espécies colhidas, assim como do período e do concelho em que essa colheita se realizou.

Foram processados 164 *pools* de culicídeos, que correspondem a 5230 fêmeas no estágio de adulto. A distribuição por região, apresentada no Quadro 22, é proporcional aos culicídeos adultos colhidos.

Quadro 22: Número de *pools* e de mosquitos processados por cada ARS

ARS	Total ♀	♀ em <i>pools</i>	<i>Pools</i>	% ♀ em <i>pools</i>
Alentejo	9511	2776	82	29 %
Algarve	9370	1723	50	18 %
Centro	2939	661	29	22 %
LVT	0	0	0	0 %
Norte	79	70	3	89 %
<b>Total</b>	<b>21899</b>	<b>5230</b>	<b>164</b>	<b>24 %</b>



No quadro 23 é apresentada a distribuição dos *pools* preparados por cada um dos concelhos estudados. Alcácer do sal, Portimão e Figueira da Foz foram os concelhos em que, quer pela quantidade, quer pela diversidade de espécies de culicídeos se prepararam mais *pools*.

Quadro 23: Número de *pools* e de mosquitos processados por ARS e por concelho

Concelho	Mosquitos ♀	<i>pools</i>
ARS Alentejo		
Alcácer do Sal	807	19
Arronches	0	0
Beja	74	5
Elvas	197	6
Estremoz	567	12
Évora	270	6
Ferreira	200	6
Gavião	4	1
Grândola	192	9
Monforte	167	8
Montemor	100	2
Moura	0	0
Mourão	102	3
Ponte de Sor	6	1
Portalegre	0	0
Sines	90	4
ARS Algarve		
Albufeira	598	13
Faro	185	8
Loulé	322	11
Portimão	618	18
ARS Centro		
Aveiro	0	0
Coimbra	47	6
Figueira da Foz	404	14
Ílhavo	5	1
Montemor-o-Velho	43	3
Murtosa	4	1
Soure	158	4
ARS Norte		
Maia	70	3
<b>Total</b>	<b>5230</b>	<b>164</b>

A preparação dos *pools* seguiu proporcionalmente a prevalência de culicídeos no meio ambiente.

Assim foram privilegiados os meses de Julho, Agosto e Setembro (Quadro 24).

Quadro 24: Número de *pools* e de mosquitos processados por data.

Mês	Mosquitos ♀	Pools
Maio	50	1
Junho	259	7
Julho	1661	51
Agosto	1484	40
Setembro	1475	47
Outubro	301	18

As espécies com maior número de *pools* preparados correspondem às mais prevalentes e às mais importantes como vetores de flavivírus, como é o caso dos culicídeos do género *Culex* (Quadro 25).

Seis das espécies identificadas não foram estudadas em *pools* ou porque foram capturadas como estágio imaturo, ou em número reduzido, como se pode verificar no Quadro 17, página 39).

Quadro 25: Número de *pools* e de mosquitos processados por espécie

Espécie	Mosquitos ♀	Pools
<i>Anopheles</i> spp.	27	1
<i>An. claviger</i> s.l.	20	1
<i>An. maculipennis</i> s.l.	21	6
<i>Coquilletidea richiardii</i>	9	2
<i>Culiseta annulata</i>	8	1
<i>Cs. longiareolata</i>	25	2
<i>Culex perexiguus</i>	30	5
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	2779	80
<i>Cx. theileri</i>	852	27
<i>Ochlerotatus caspius</i>	1451	37
<i>Oc. detritus</i>	8	2

No total dos 164 *pools* analisados, a presença de RNA de flavivírus foi confirmada num *pool* de *Ochlerotatus caspius* capturados na Ria do Alvor, em 23 Setembro e em dois *pools* de *Culex theileri* capturados em Alcácer do Sal em Julho.

Por pesquisa de semelhanças de sequências no GenBank determinou-se que o flavivírus detectado na Ria de Alvor, em *Oc. caspius*, tem uma sequência idêntica (cerca de 95% de

semelhança) a sequências de flavivírus de mosquitos detectados na mesma espécie de mosquitos, *Oc. caspius*, em Itália.

A sequência identificada em Alcácer do Sal, em *Cx. theileri*, é idêntica a sequências de um flavivírus de mosquitos (vírus Wang Thong).

A Taxa Mínima de Infecção (MIR)<sup>23</sup> determinada

(23) Taxa mínima de Infecção (MIR) = (n.º *pools* positivos / n.º total de mosquitos testados) x 1000.



no Algarve para *Oc. caspius* foi de 1,3 e na região do Alentejo, para *Cx.theileri*, foi de 3.

Estando estabelecido na bibliografia que se os valores de MIR forem iguais a zero revelam ausência de actividade viral, até valores de quatro existe alguma actividade viral e que se forem superiores a quatro indiciam a necessidade de actuação com medidas de controlo. Os valores obtidos, apesar de revelarem alguma actividade viral, não se apresentam próximos de valores preocupantes.

Salienta-se que as sequências de flavivírus detectadas não têm semelhança próxima com flavivírus patogénicos para o Homem, não sendo, portanto, considerado como relevante para a tomada de medidas de Prevenção em Saúde Pública.

#### 4.6. Conclusões

Os resultados do segundo ano do programa REVIVE contribuíram para o aprofundar o conhecimento da fauna de culicídeos no território do continente, assim como do seu potencial papel de vector.

Os resultados obtidos demonstram que a experiência acumulada nos trabalhos deste projecto, pelos responsáveis e técnicos das regiões, se reflectiu em saídas de campo mais eficazes do que no ano experimental, isto é, com menor esforço, obtiveram-se maiores sucessos de captura.

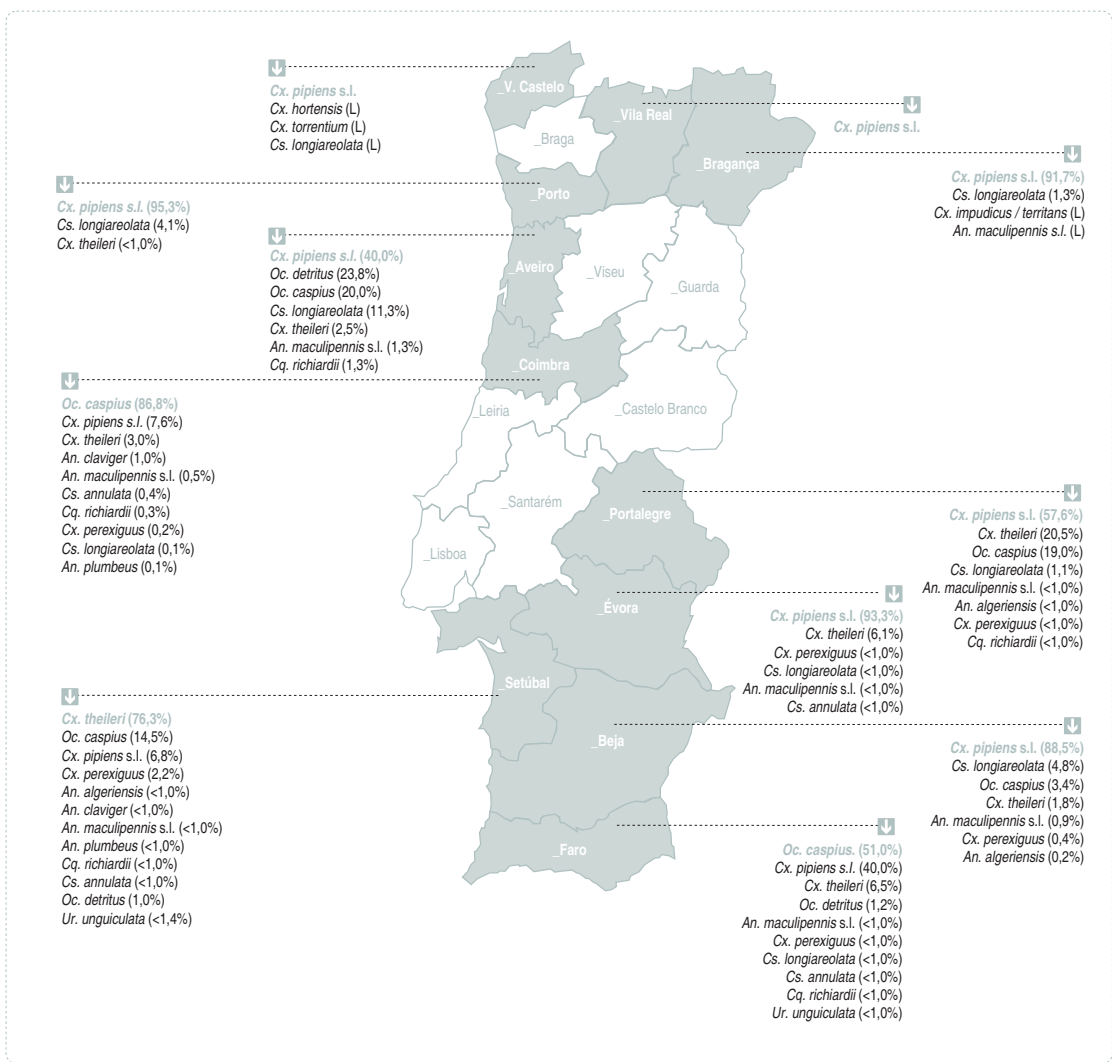
Foram criados mapas de distribuição de culicídeos com a respectiva abundância relativa (Figura 8).

O potencial vector das espécies colhidas foi testado laboratorialmente, tendo sido detectados flavivírus.

Não foram detectadas espécies exóticas/invasoras nas amostras enviadas ao laboratório.



Figura 8: Mapa de distribuição de espécies de culicídeos em Portugal continental. REVIVE 2009



05

# resultados

# 2008 / 2009

## Conclusões



Em 2008 participaram nos trabalhos de recolha e envio ao laboratório as ARS's do Alentejo, Algarve, Lisboa e vale do Tejo e Norte.

Em 2009 participaram as ARS's do Alentejo, Algarve, Centro e Norte.

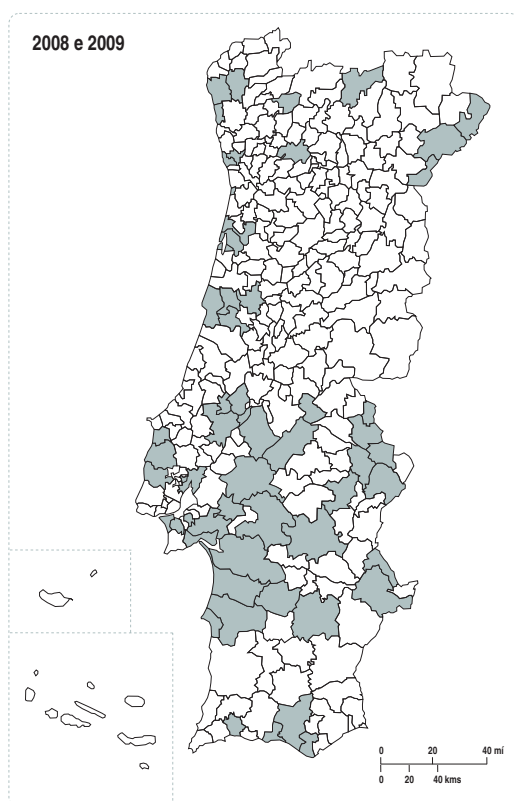
No balanço dos dois anos do REVIVE verificou-se que em 2009 o número de armadilhas/noite baixou em relação a 2008. O mesmo se aplica ao número de concelhos abrangidos pelo REVIVE, que, de 43 concelhos amostrados em 2008, passou a 31 em 2009 (Quadro 26, Figura 9).



Quadro 26: Comparação dos resultados da amostragem 2008 / 2009

	2008	2009
<b>Colheitas Adultos (Armadilhas / noite)</b>	<b>226</b>	<b>227</b>
Concelhos	43	31
Adultos capturados	18305	23336
♀	17075	21899
♂	1230	1437
N.º de espécies	11	14
<b>Colheitas Larvas (boletins)</b>	<b>143</b>	<b>59</b>
Concelhos	37	23
Larvas capturados	3340	2397
N.º de espécies	8	8

Figura 9: Concelhos de Portugal em que foram feitas colheitas de culicídeos em 2008 e 2009



O volume total das amostras colhidas no campo foi superior em 2009.

Os meses em que se colheram mais espécimes variaram de um ano para o outro assim como o sucesso de captura (Figura 10 e Figura 11).

Os valores do sucesso de captura são calculados unicamente com os resultados das colheitas de adultos.

Agosto foi o mês em que se colheram menos mosquitos em 2008, tendo acontecido exactamente o contrário no ano seguinte, com um sucesso de captura três vezes superior. Esse facto poderá ter ocorrido por razões ambientais, climáticas ou mesmo pela experiência acumulada dos técnicos. Só a continuação da recolha de amostras e o processamento com os dados climáticos e ambientais num período mais alargado vai permitir encontrar uma explicação.

Figura 10: Número de larvas e adultos e sucesso de captura em 2008.

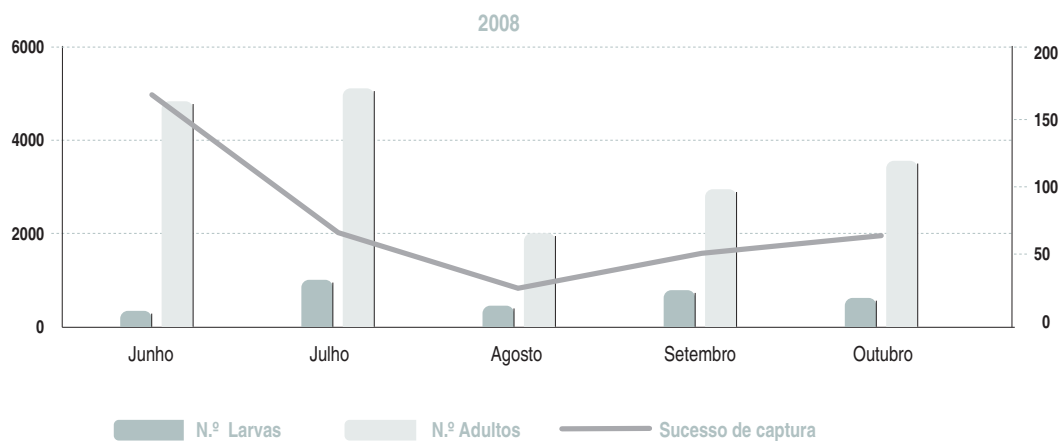
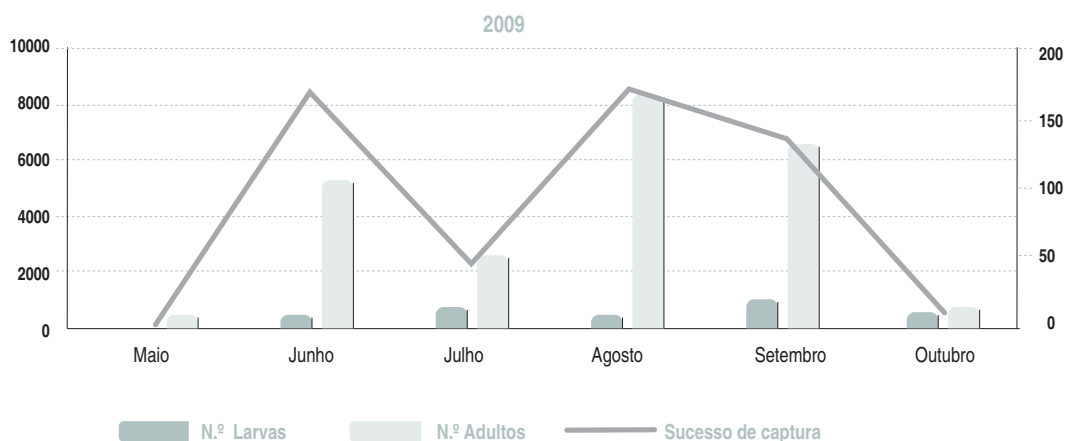


Figura 11: Número de larvas e adultos e sucesso de captura em 2009.



O estudo comparativo do sucesso de captura por região em 2008 (Figura 12) e 2009 (Figura 13) mostra que de um ano para o outro as regiões que participaram nos dois anos obtiveram melhores resultados com menor esforço.

Depreende-se que o sucesso de captura (menos colheitas, mais capturas) foi superior no Algarve que já tinha experimentado um projecto idêntico em anos anteriores, e menor nas duas ARS's que participaram num único ano e no Norte que não investiu tanto em número de colheitas.



Figura 12: Número de colheitas e sucesso de captura por ARS em 2008.

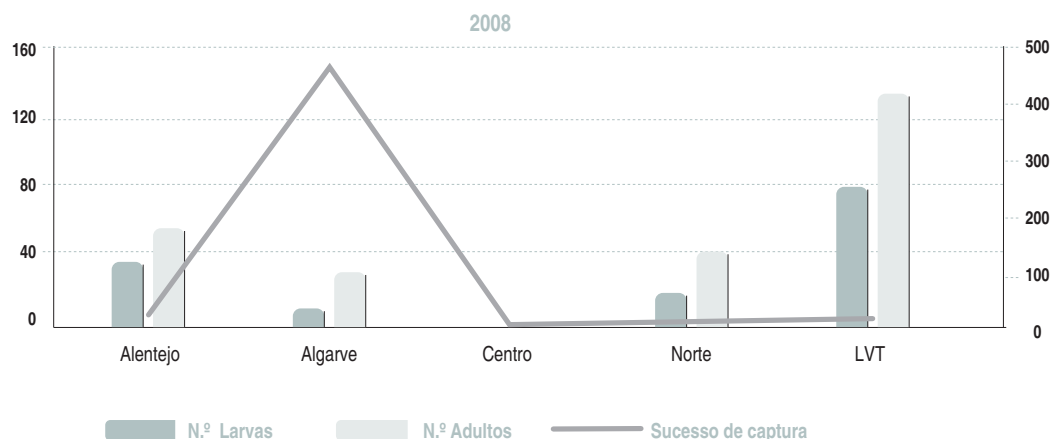
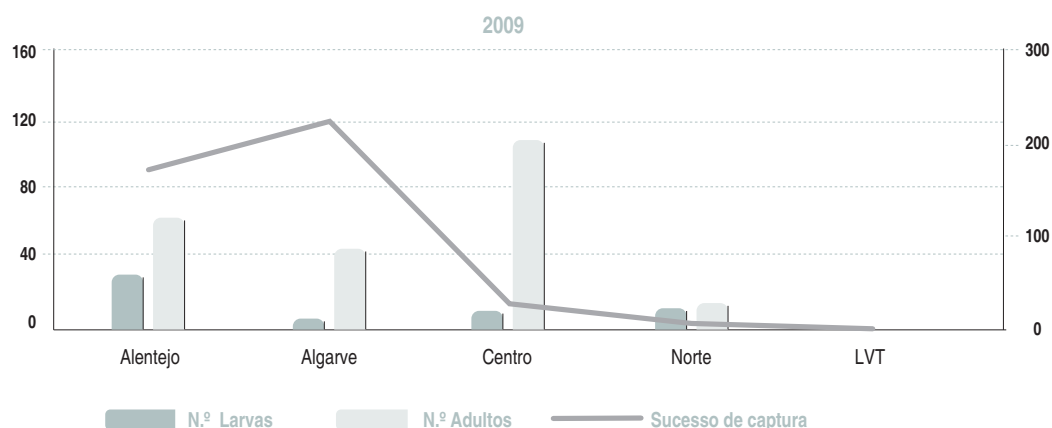


Figura 13: Número de colheitas e sucesso de captura por ARS em 2009.



Em 2008 foram identificadas oito espécies colhidas como larvas e 11 espécies de adultos, perfazendo no total 13 espécies diferentes.

Em 2009, o REVIVE identificou 16 espécies, destas oito colhidas como larvas e 14 como adultos (Quadro 27).

Em 2009 não foram detectados espécimens de *Cx. laticinctus*. Esta espécie, em 2008, tinha sido identificada só em estádios imaturos, em Mourão e Grândola, no Alentejo. Nestes dois locais, em 2009, também foram feitos esforços para a recolha de larvas, tendo, no entanto, sido identificadas outras espécies.

*Anopheles plumbeus*, *Coquillettidea richiardii*, *Culex torrentium* e *Cx. impudicus/territans* foram, no REVIVE, detectadas este ano pela primeira vez.

*An. plumbeus* foi identificado em amostras recebidas de Sines e Coimbra, *Cq. richiardii* de Aveiro, Monforte, Sines e Coimbra, *Cx. torrentium* e *Cx. impudicus/territans* chegaram em amostras do Norte, respectivamente de Viana do Castelo e de Freixo de Espada à Cinta.

Quadro 27: ↓ Espécie de *culicídeos* identificados em 2008 e em 2009 em ambos os estádios

Espécies	2008		2009	
	Larvas	Adultos	Larvas	Adultos
<i>Anopheles algeriensis</i>		V		V
<i>An. claviger</i> s.l.		V		V
<i>An. maculipennis</i> s.l.	V	V	V	V
<i>An. plumbeus</i>				V
<i>Coquilletidea richiardii</i>				V
<i>Culiseta annulata</i>		V	V	V
<i>Cs. longiareolata</i>	V	V	V	V
<i>Culex hortensis</i>	V		V	
<i>Cx. impudicus/territans</i>			V	
<i>Cx. laticinctus</i>	V			
<i>Cx. perexiguus</i>	V	V		V
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	V	V	V	V
<i>Cx. theileri</i>	V	V	V	V
<i>Cx. torrentium</i>			V	
<i>Ochlerotatus caspius</i>		V		V
<i>Oc. detritus</i>		V		V
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	V	V		V
<b>N.º de espécies</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>14</b>

Nas pesquisas de vírus efectuadas no CEVDI/INSA, em ambos os anos, não foram detectados flavivírus patogénicos para o homem, como por exemplo o vírus *West Nile*.

No entanto, foram detectados outros flavivírus, que não são reconhecidos como patogénicos e que têm sido detectados em todo o mundo, estando actualmente a ser investigada a sua importância em termos de filogenia dos flavivírus transmitidos por mosquitos.

Em Junho e Julho de 2008 foram identificados *pools* com RNA de flavivírus, com semelhanças ao vírus Wang Thong, em *Culex theileri* em três locais do Algarve e Lisboa e vale do Tejo e, em 2009, no Algarve. Parece existir sazonalidade na ocorrência de mosquitos infectados, provavelmente porque os mosquitos do género *Culex* surgem, sobretudo, nos primeiros meses da época estival, sendo, posteriormente, substituídos por *Ochlerotatus*<sup>24</sup> (Quadro 28).

Em Setembro de 2008 foi detectado, na lagoa dos Salgados, um flavivírus semelhante a outro vírus detectado em Itália, na mesma espécie de culicídeos, nomeadamente *Ochlerotatus caspius*. Em 2009, o mesmo vírus foi detectado alguns quilómetros para ocidente na ria do Alvor.

(24) Osório, HC, Amaro, F, Zé-Zé, L, Moita, S, Labuda, M, Alves MJ. Species composition and population dynamics of adult mosquitoes of southern Portugal. European Mosquito Bulletin 2008; 25: 12-23.



Quadro 28: Locais, espécies e meses em que foram identificados flavivírus de mosquitos

	2008			2009		
	Lagoa dos Salgados (Albufeira)	Vale do Carregado (Vila Franca)	Coruche	Lagoa dos Salgados (Albufeira)	Alcácer	Ria de Alvor (Portimão)
<i>Flavivírus em Culex theileri</i>	Junho	Julho	Julho		Julho	
<i>Flavivírus em Ochlerotatus caspius</i>				Setembro		Setembro

A presença de vírus aparentemente específicos de mosquitos e próximos dos flavivírus tem vindo a ser detectada em todo o mundo<sup>25,26,27,28</sup> embora ainda se conheça muito pouco sobre as suas características biológicas e potenciais impactos ecológicos, noutros vírus e mosquitos vectores. Tendo em conta os dados actuais, estes flavivírus têm sido considerados não patogénicos para o homem.

No entanto, a sua importância como indutores de imunidade cruzada contra outros flavivírus tem sido proposta, nomeadamente na península de Yucatan, no México, em que a protecção parcial da população local contra infecção pelo vírus *West Nile* pode ser justificada pela imunidade pré-existente contra outro flavivírus.

Em Portugal, a colocação desta hipótese também parece verosímil, uma vez que nos últimos anos apenas foi reportada a infecção de dois turistas irlandeses em 2004<sup>29</sup> e não têm sido reportados casos em doentes nacionais, apesar de a circulação do vírus ser comprovada serologicamente em cavalos e aves<sup>30</sup>.

Outra hipótese colocada que justifica a importância biológica e em Saúde Pública destes flavivírus, envolve um fenómeno comum em vírus que é descrito como a superinfecção, em que poderá ocorrer a exclusão competitiva entre flavivírus co-circulantes na população de vectores.

A ausência de detecção de *pools* de mosquitos positivos para o vírus *West Nile* sugere que o vírus possa estar presente esporadicamente no nosso país, por introduções pontuais, nomeadamente por aves migratórias, ou se mantenha em níveis abaixo do nível de detecção ou em nichos muito limitados geograficamente.

Os resultados obtidos em 2008 e 2009 no projecto REVIVE contribuíram, para o conhecimento real da distribuição de espécies de mosquitos (Figura 14).

(25) Blitvich, B. J. *et al.* Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex flavivirus*, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *J Med Entomol* 2009. vol. 46, 4: 934-941.

(26) Hoshino K. *et al.* Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 2007. vol. 359, 2: 405-414.

(27) Cook S. Isolation of a new species of flavivirus and a novel strain of *Culex flavivirus* (Flaviviridae), from a natural mosquito population in Uganda. *J Gen Virol* 2009. vol. 90, 11: 2669-2678.

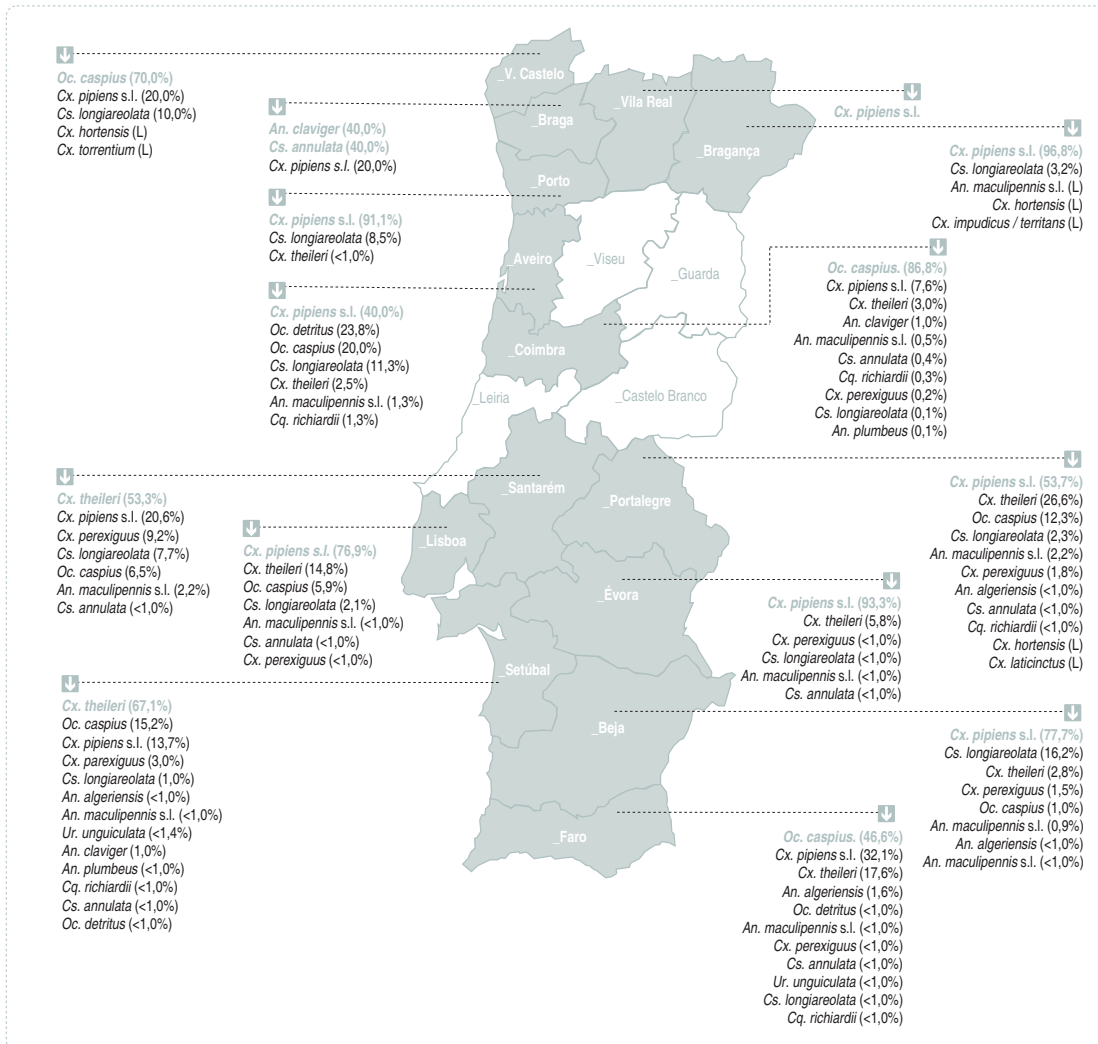
(28) Farfen-Ale J. A. Detection of RNA from a novel *West Nile*-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2009. vol. 80, 1: 85-95.

(29) Connell J. Two linked cases of West Nile virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal *Eurosurveillance* 2004. vol 8, 32.

(30) Assumpção SB, Osório HC, Alves MJ. Detection of West Nile virus antibodies in horses of southern Portugal. 4th Congress of the European Society for Emerging Infections. Lisboa 30 Set.-3 Out. 2007.



Figura 14: Mapa de distribuição de espécies de culicídeos. REVIVE 2008 e 2009.



**Em 2008 o REVIVE:**

\_Preparou uma proposta de panfleto informativo sobre mosquitos;

\_Procedeu à compra de armadilhas, aspiradores, caços e copos, que foram distribuídos pelas ARS's;

\_Organizou uma acção de formação para os técnicos das ARS's;

\_Realizou um inquérito epidemiológico para agentes transmitidos por vectores com a participação da maioria dos técnicos REVIVE;

\_Capturou mosquitos, em vários estádios de desenvolvimento, entre os meses de Maio e Outubro, em 43 concelhos do país, num total de 266 armadilhas/noite;

\_Enviou os mosquitos capturados ao laboratório, que identificou 14 espécies diferentes de mosquitos, não exóticas, e pesquisou cerca de 50% para flavivírus – sem identificação de flavivírus patogénicos para o Homem;

\_Preparou um relatório, enviado às instituições envolvidas, nomeadamente Administrações Regionais de Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e Direcção Geral de Saúde, com os resultados REVIVE 2008.



### Em 2009 o REVIVE:

\_Organizou o 1.º workshop REVIVE, aberto a todos os colaboradores, para apresentação e discussão dos resultados de 2008;

\_Capturou mosquitos, em vários estádios de desenvolvimento, entre os meses de Maio e Outubro em 31 concelhos do país, num total de 227 armadilhas/noite;

\_Enviou os mosquitos capturados ao laboratório, que identificou 16 espécies diferentes de mosquitos, não exóticas, e pesquisou cerca de 40% para flavivírus – sem identificação de flavivírus patogénicos para o Homem;

\_Preparou um relatório, enviado às instituições envolvidas, nomeadamente Administrações Regionais de Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e Direcção Geral de Saúde, com os resultados REVIVE 2009.

Nos dois anos de existência do REVIVE foram amostrados culicídeos em 54 concelhos de Portugal continental (19,4%), tendo sido descritas 18 espécies de mosquitos, isto é, 45% das espécies já notificadas nas várias regiões, o que tem contribuído para o conhecimento cada vez mais exacto da distribuição de mosquitos de Portugal.

No âmbito do REVIVE 2008 e 2009 foram construídos mapas de distribuição de espécies de culicídeos por concelhos e distritos de Portugal continental nos quais se resumem os resultados das espécies identificadas, assim como a respectiva abundância.

A capacidade vectorial para flavivírus foi estudada em 40 a 50% dos mosquitos colhidos.

O REVIVE tem gerado dados de qualidade que permitem entender a distribuição geográfica, a ecologia e o impacto das alterações ambientais no planeamento de estudos de vigilância e determinação de risco de doença.

# \_perspectivas \_futuras



[www.insa.pt](http://www.insa.pt)



Relatório Revive 2008 / 2009  
Programa Nacional de  
Vigilância de Vectores Culicídeos

A continuação e expansão deste estudo a uma área geográfica mais abrangente e a captura de mosquitos em anos sucessivos permitirá continuar o estudo dos flavivírus de mosquito detectados (nomeadamente determinar a sua especificidade relativamente aos vectores), tal como detectar outros flavivírus que estejam presentes ou sejam entretanto introduzidos.

Em relação à detecção atempada de introdução de espécies exóticas de mosquitos deveria ser ponderado, no âmbito do REVIVE, a diversificação dos métodos de colheita dos diferentes estádios de culicídeos, por exemplo com uma utilização mais sistemática de aspiradores em zonas urbanas e peri-urbanas para optimização de colheitas de *Aedes*.

Também no sentido de se detectar atempadamente as espécies exóticas, e segundo o Regulamento Sanitário Internacional, as zonas de Portos e Aeroportos deveriam ser objecto de estudo mais aprofundado e sistemático.

As flutuações populacionais de culicídeos e os factores que as condicionam, assim como a importância na transmissão de flavivírus, serão, sem dúvida, tornados mais perceptíveis com a continuação deste projecto.

07

# \_participantes

# \_Revive


[www.insa.pt](http://www.insa.pt)


Relatório Revive 2008 / 2009  
Programa Nacional de  
Vigilância de Vetores Culiçídeos

Maria de Fátima Monteiro Alho	ARS Centro	Ana Rita Cruz	ARS Norte
Eduardo Jorge Rodrigues de Almeida	ARS Centro	Carlos Daniel	ARS Norte
Maria João Alves	CEVDI/INSA	Ana Cristina Gomes Dias	ARS LVT
Sandra Alves	ARS Norte	Orlando Duarte	ARS Norte
Fátima Amaro	CEVDI/INSA	José Gomes Esteves	ARS Alentejo
Conceição Amorim	ARS Norte	Carlos Estevinha	ARS Alentejo
Carina Andrade	ARS Norte	Carla Sofia C. Matos Fernandes	ARS LVT
Delfina Antunes	ARS Norte	Maria Duarte Pereira Fernandes	ARS Centro
Jaime Baptista	ARS Norte	Anabela Fernandes	ARS Norte
Pedro Bento	ARS Alentejo	Vera Ferreira	ARS Alentejo
Mónica Betencourt	ARS Alentejo	Manuel Fraga	ARS Norte
Ana Borda d'Água	CEVDI/INSA	Ana Mafalda Franco	ARS Alentejo
António Borges	ARS Norte	Luís Freixo	ARS Norte
Leonel Buco	ARS Alentejo	Sílvia Gaspar	ARS Alentejo
Sónia Caeiro	ARS Alentejo	Conceição Giraldes	ARS LVT
João Camacho	ARS Algarve	Vítor Gomes	ARS LVT
Ana Camisa	ARS Norte	Célia Cristina Pires Gomes	ARS LVT
Cristina Campeão	ARS Norte	Diogo Gomes	ARS Alentejo
Fernando Manuel Leal Campos	ARS Centro	José Gonçalves	ARS LVT
Fernando Carvalho	ARS Alentejo	Ana Júlia Gouveia	ARS Norte
José Manuel Ramos Cerdeira	ARS Centro	Nélia Guerreiro	ARS Algarve
Lígia Chainho	CEVDI/INSA	Jacinto Guerreiro	ARS Alentejo
Susana Maria Barata e Coito	ARS LVT	Ana Rita Prieto Henriques	ARS LVT
Marinela Cristo	ARS Norte	Aníbal Ferreira João	ARS Norte



---

Monteiro Júnior	ARS LVT	Cedric Samorinha	ARS Norte
Victor Lourenço	ARS Norte	Ana Rita Santos	ARS LVT
António Francisco Mendonça Lucas	ARS Centro	Sandra Santos	ARS Norte
Teresa Luz	CEVDI/INSA	Sílvia Silva	ARS Norte
Vera Machado	ARS LVT	Agostinho Simão	ARS Alentejo
José Machado	ARS Norte	António Aristides Sousa	ARS Norte
Judite Maia	ARS Centro	Fátima Sousa	ARS Norte
Carla Mariano	ARS Alentejo	Vítor Vaz	ARS Algarve
Cristina Marques	ARS Alentejo	Líbia Zé-Zé	CEVDI/INSA
Liliana Marques	ARS Alentejo		
Márcia Marques	ARS Alentejo		
Inês Mateus	ARS Alentejo		
Francisco Mendonça	ARS Algarve		
Mendonça	ARS Alentejo		
Márcia Monteiro	ARS Alentejo		
João Paulo Monteiro	ARS Norte		
Anabela dos Santos Ribeiro Moura	ARS Centro		
Maria José Vicente Narciso	ARS LVT		
Maria Margarida Narciso	ARS LVT		
Helena Nascimento	ARS Norte		
Hugo Nereu	ARS Alentejo		
Sofia Núncio	CEVDI/INSA		
Sofia Nunes	ARS Algarve		
Natalina Nunes	ARS Alentejo		
Cláudia Oliveira	ARS Alentejo		
Felicidade Ortega	ARS Alentejo		
Hugo Osório	CEVDI/INSA		
Conceição Paliotes	CEVDI/INSA		
Paulo Parreira	CEVDI/INSA		
Pedro Brilha Patrício	ARS LVT		
Ana Maria Paulino	ARS Alentejo		
José Pereira	ARS Algarve		
Lúcia Maria Silvestre Pereira	ARS LVT		
Maria do Carmo Morais Pereira	ARS LVT		
Sara Pinheiro	ARS Alentejo		
Manuel Pinheiro	ARS Norte		
Carlos Alberto Saraiva Pinto	ARS LVT		
Cândida Pinto	ARS Norte		
Cláudia Sofia Fernandes Raminhos	ARS LVT		
António Raposo	ARS Alentejo		
Luís Ribeiro	ARS Alentejo		
José Guilherme Ribeiro	ARS Norte		
Paula Rodrigues	ARS Norte		
José Rola	ARS Norte		
Gabriela Saldanha	ARS Norte		
Luísa Salvado	ARS LVT		

---

\_ Direcção Geral da Saúde  
\_ Divisão de Saúde Ambiental

\_ Instituto Nacional de Saúde  
\_ Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas

\_ Administrações Regionais de Saúde

08

# anexo

\_ Programa Nacional de Vigilância de Vectores Culicídeos



## I. Justificação

As doenças transmitidas por mosquitos já constituíram graves problemas de saúde pública na Europa. Doenças como a malária, dengue e febre amarela foram erradicadas da Europa em meados do século XX, continuando, no entanto, a existir em muitas zonas as espécies de mosquitos responsáveis pela transmissão destas patologias. Os vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus), que provocam encefalites virais, são bem conhecidos surgindo, ocasionalmente, surtos epidémicos de vírus *West Nile* (género *Flavivirus*).

A ocupação de novos espaços por potenciais mosquitos vectores de arbovírus deve ser sempre considerada sobretudo devido às provas já existentes, como a introdução do mosquito *Aedes albopictus* na Europa. Este mosquito foi introduzido na Albânia e no sul de Itália, tendo-se estabelecido muito rapidamente em toda a Itália e sul de França. Em 2004, esta espécie foi encontrada na Catalunha, Espanha. Experimentalmente demonstrou-se que este mosquito é competente na transmissão de 23 arbovírus.

A maior parte dos agentes de doença transmitidos por vectores exibem um padrão sazonal distinto, o que sugere, muito claramente, que os parâmetros climáticos são importantes na epidemiologia das doenças transmitidas por vectores. Alguns factores climáticos como a temperatura, precipitação, humidade e a velocidade e direcção do vento influenciam fortemente a ecologia, desenvolvimento, comportamento e sobrevivência dos vectores e hospedeiros, e consequentemente a dinâmica da transmissão da doença.

As alterações climáticas constituem uma nova categoria de perigo para a saúde pública, sendo actualmente incontestável o aquecimento global do planeta. Em Portugal, as projecções indicam que, nos próximos 50 anos, um em cada cinco dias poderá ter temperaturas superiores a 35°C. Relativamente à precipitação, as projecções



apontam para um clima mais seco, com um período húmido mais curto e mais intenso, seguido de uma época quente mais longa. Assim, prevê-se uma maior frequência de períodos de seca que afectará essencialmente a zona sul do País. Estas alterações da frequência e da intensidade dos fenómenos climáticos e meteorológicos extremos constituem um grave risco para a saúde humana, destacando-se os aumentos potenciais de mortes relacionadas com o calor, de doenças transmitidas pela água e pelos alimentos, de problemas relacionados com a poluição atmosférica e do risco de doenças transmitidas por vectores.

Para determinar a potencial incidência destas doenças, é necessário identificar e determinar a prevalência destes vectores. Factores como a temperatura, a chuva, os ventos, os ciclos de vida dos vectores, as flutuações sazonais nas populações de vectores, entre outros, são aspectos relevantes a ter em consideração.

Os vectores que constituem o objecto deste programa são os culicídeos (mosquitos) relativamente aos quais é necessário implementar dispositivos multidisciplinares abrangendo quatro áreas fundamentais:

- 1 - Vigilância entomológica
- 2 - Vigilância humana
- 3 - Vigilância animal
- 4 - Prevenção da picada

### 1. Vigilância Entomológica

A vigilância entomológica permite:

- \_ Identificar a densidade e distribuição geográfica das populações de mosquitos;
- \_ Identificar áreas geográficas de alto risco;
- \_ Monitorizar a efectividade e eficácia das medidas de controlo desenvolvidas.

### 2. Vigilância humana

Informação dos clínicos e do laboratório de casos prováveis ou positivos de doenças transmitidas por mosquitos.

### 3. Informação dos responsáveis de veterinária

Informações dos Laboratórios veterinários e de estudos ambientais (por exemplo dados de aves (reservatório de *West Nile*) e equinos (hospedeiro acidental de *West Nile*).

### 4- Prevenção da picada

A prevenção individual da picada inclui o uso de repelentes, o evitar frequentar locais entre o entardecer e o amanhecer onde exista uma maior abundância de mosquitos, o uso de vestuário protector, a instalação de redes mosquiteiras, a eliminação de águas estagnadas dentro e próximos das habitações e aplicação de insecticidas domésticos nas habitações.



## II Objectivos

Este protocolo tem como objectivo a determinação do nível de risco associado à presença de mosquito no território português.

Para tal é necessário criar um programa nacional de informação, vigilância.

Mais detalhadamente pretende-se:

1. Criar formas de campanhas de educação, informação da população e comunidade médica.
2. Apetrechar as ARS para a colheita periódica ou esporádica de vectores culicídeos.
3. Vigiar a actividade de mosquitos vectores, caracterizando as espécies e a ocorrência sazonal em locais previamente seleccionados, detectar atempadamente a introdução de *Aedes albopictus*.
4. Emitir alertas para adequação das medidas de controlo, em função da densidade de vectores identificada.

## III Linhas Programáticas

A concretização do Programa será operacionalizada pelas Administrações Regionais de Saúde (ARS's), através dos seus técnicos de Saúde Ambiental, dos Serviços de Saúde Pública, e pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, através do Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI/INSA).

### As Administrações Regionais de Saúde cabe a responsabilidade de:

1. Providenciar a deslocação e ajudas de custo dos técnicos que no seu entender sejam necessários para a formação no INSA (ou local a designar pelo mesmo)
2. Seleccionar três postos biológicos na área geográfica de influência, em função de zonas consideradas de maior risco;
3. Colocar e recolher quinzenalmente as armadilhas, em cada posto biológico, de Maio a Outubro;
4. Providenciar o transporte dos espécimes colhidos ao CEVDI/INSA.

### Ao CEVDI/INSA cabe a responsabilidade de:

1. Providenciar local e formadores para a formação dos técnicos indicados pelas ARS's;
2. Preparação de ficha para dados no campo;
3. Contribuição para a selecção dos locais de colheita;
4. Identificação dos Artrópodes Hematófagos colhidos – culicídeos;
5. Identificação dos agentes virais que eventualmente estejam a infectar esses espécimes;
6. Elaboração de relatório.

A **gestão da informação** produzida pela monitorização da entomofauna será efectuada pelas ARS's/Serviços de Saúde Pública, sendo estas entidades responsáveis por emitir alertas, determinar medidas correctoras no sentido de restringir a proliferação de insectos vectores, utilizando para o efeito os meios que considerar adequados.

Além disso, a informação gerada por este sistema pode ser utilizada pelas Instituições intervenientes para fins técnico-científicos nomeadamente para investigação, projectos afins, comunicações ou outros trabalhos científicos.



## IV Actividades e Avaliação

As actividades de campo, a executar pelos Serviços de Saúde Pública, iniciam-se após curso de formação dado pelos profissionais do CEVDI/INSA aos Técnicos de Saúde Ambiental e às Autoridades de Saúde, em colaboração com a DGS.

De todo o trabalho realizado serão efectuadas avaliações conjuntas e elaborada uma nova programação baseada na evidência.

## V Validade do Protocolo

Este protocolo é valido por um período de dois anos após a data de assinatura.

## VI Encargos financeiros

Às ARS's compete os encargos referentes a:

- \_Despesas relacionadas com a assistência à formação
- \_Aquisição de gelo seco;
- \_Aquisição de termómetros analógicos;
- \_Aquisição de higrómetro;
- \_Colheita e transporte dos mosquitos até ao CEVDI/INSA quinzenalmente para análise;

**Cada ARS receberá a quantia de 5.000,00 € para suportar os encargos acima referidos.**

Ao **CEVDI/INSA** compete encargos referentes a:

- \_Aquisição de 3 armadilhas de mosquitos e respectivo material adicional (sacos de recolha de mosquitos, baterias e carregador) por cada ARS.
- \_Equipamento para identificação dos artrópodes hematófagos – culicídeos;
- \_Equipamento e reagentes necessários para a identificação agentes virais que eventualmente estejam a infectar esses espécimes.

**O CEVDI/INSA receberá a quantia de 30.500,00 € para suportar os encargos acima referidos com as 5 ARS.**

## VII Serviço responsável

ARS

Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas/ Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

## VIII Coordenação

ARS

CEVDI/INSA

### **Observação:**

Este programa e respectivo protocolo só tem como objectivo a determinação do nível de risco associado à presença de mosquitos no território português.

Este programa de trabalho é complemento do Protocolo assinado com cada ARS e pelo INSA.



1899



Ministério da Saúde



Instituto **Nacional de Saúde**  
*Doutor Ricardo Jorge*

Direcção-Geral da Saúde  
[www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)



Ministério da Saúde

#### Departamento de Doenças Infecciosas

**Instituto Nacional de Saúde** *Doutor Ricardo Jorge*  
*Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal*  
Tel.: (+351) 217 519 200  
Fax: (+351) 217 526 400  
E-mail: [info@insa.min-saude.pt](mailto:info@insa.min-saude.pt)

**Centro de Saúde Pública** *Doutor Gonçalves Ferreira*  
*Rua Alexandre Herculano, n.321 4000-055 Porto, Portugal*  
Tel.: (+351) 223 401 100  
Fax: (+351) 223 401 109  
E-mail: [inforporto@insa.min-saude.pt](mailto:inforporto@insa.min-saude.pt)

**Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas**  
*Doutor Francisco Camboumac*  
*Av. da Liberdade, n.5 2965-575 Águas de Moura, Portugal*  
Tel.: (+351) 265 938 290 / 265 938 295 / 265 912 222  
Fax: (+351) 265 912 155  
E-mail: [cevdi@insa.min-saude.pt](mailto:cevdi@insa.min-saude.pt)

[www.insa.pt](http://www.insa.pt)