

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE *Zika virus* EM *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* USANDO CARTÕES FTA EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

Bruna Antoniety Oliveira

Belo Horizonte

2019

Bruna Antoniety Oliveira

PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE *Zika virus* EM *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* USANDO CARTÕES FTA EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Eduardo Eiras
(UFMG)

Co-orientadora: Dr. Marcele Neves Rocha
(IRR/FIOCRUZ MINAS)

Belo Horizonte

2019

043

Oliveira, Bruna Antoniety.

Padronização da detecção de *Zika virus* em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* usando cartões FTA em condições de laboratório [manuscrito] / Bruna Antoniety Oliveira. – 2019.

83 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Eduardo Eiras. Co-orientadora: Marcele Neves Rocha.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Zika virus*. 3. *Aedes*. 4. DNA Viral. 5. Preservação de Amostras. I. Eiras, Álvaro Eduardo. II. Rocha, Marcele Neves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Antoniety Oliveira399/2019/12
entrada
1º/2017
2017652398

Às quatorze horas do dia 22 de março do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “**Padronização da detecção de Zika Virus em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* usando cartões FTA[®] em condições de laboratório**” área de **concentração: Entomologia**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dr. Álvaro Eduardo Eiras**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Álvaro Eduardo Eiras	UFMG	Aprovada
Dr. Fabiano Duarte Carvalho	IRR/FIOCRUZ- BH	APROVADA
Dra. Giliane de Souza Trindade	UFMG	APROVADA
Dra. Marcele Neves Rocha	IRR/FIOCRUZ	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	Não
Recomendações	Não
Sugestões	Encontramos nas cópias dos examinadores

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 22 de março de 2019.

Dr. Álvaro Eduardo Eiras
(Orientador)

Dr. Fabiano Duarte Carvalho

Dra. Giliane de Souza Trindade

Dra. Marcele Neves Rocha
(Co-orientadora)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

 Prof. Ricardo Torquato Pujawara
 Coordenador do Programa de
 Pós-Graduação em Parasitologia
 ICB/UFMG - SIAPE 1669075

AGRADECIMENTOS

Á Deus por me dar forças e capacidade para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

A minha mãe Sônia Santos de Oliveira e ao meu pai Cláudio Coimbra de Oliveira, que mesmo sem entender, me apoiaram e sempre se mostraram orgulhosos de mim. A minhas irmãs Thais Stefane de Oliveira e Evelin Izabelle Rosa de Oliveira, que sempre me deram palavras de incentivo e que me apoiaram nos momentos em que precisei.

A minha segunda família, Tânia, Antônio, Blenda, Chintia e Manuela, pelos momentos felizes que sempre me proporcionaram.

Ao meu companheiro Everton, que compreendeu a minha ausência e que sempre me apoiou e me incentivou durante toda a jornada, por todos os momentos em que me acalmou e disse que tudo daria certo no final, sem ele a jornada seria mais solitária.

Aos meus amigos da vida que entenderam a minha ausência em diversos momentos, principalmente, minha querida Natalia.

Aos muitos amigos que passaram pelo Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores (Lintec), pelo convívio, aprendizados e apoio, principalmente, Dani Andreza, Luana, Elis, Juliana, Elizangela, Kelly, Ana, Leo, Hill, Tales, Daniel, Sandra e Dani Cristina.

Ao meu querido amigo Richard, que saiu de amigo da minha vida acadêmica e se tornou um amigo para toda a vida, que por muitas vezes me ajudou com experimentos, sempre me ouviu nos momentos mais difíceis e que me amparou impedindo que desistisse ou olhasse para trás, sem ele a jornada se tornaria imensamente mais difícil.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, a turma do Motim, Heloíne, Rhuana, Tarcísio, Luiz, Dani e Welligton, com eles a caminhada se tornou mais prazerosa e divertida.

Aos amigos que fiz no departamento de Parasitologia, principalmente a minhas nordestinas arretadas Dani e Andressa, por todos os passeios de gordices.

Ao Álvaro pela orientação e ensinamento durante todos os anos em que estive no laboratório. A Marcele pela co-orientação e por todos os momentos de discussão do trabalho e aprendizados. Ao Marcelo que foi de extrema importância para a elaboração do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, pela oportunidade de me capacitar. A Sumara e Sibeles por sempre nos ajudar nos momentos em que estávamos perdidos.

Ao grupo de Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, sob a coordenação do Dr. Luciano Andrade Moreira, por abrir as portas e permitir que o trabalho fosse desenvolvido.

A todos os professores que muito me ensinaram e que se tornaram uma inspiração profissional devido ao amor e dedicação ao ensino.

*“Você ganha força, coragem e confiança
através de cada experiência em que você
realmente para e encara o medo de frente.”
Eleanor Roosevelt*

RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus que vem causando preocupação mundial desde os grandes surtos que ocorreram no Brasil e no mundo. Em 2015, com a entrada do vírus no Brasil foram registrados inúmeros casos de Síndrome Congênita (microcefalia) associada ao ZIKV. Até o presente, não existe vacina disponível para o ZIKV e por este motivo, a única forma de prevenir a doença é o controle do vetor. Atualmente, armadilhas para a captura de vetores adultos são empregadas como método de monitoramento das populações de insetos e a posterior análise do material genético desses vetores é utilizada como monitoramento viral. Os cartões Flinders Technology Associates (FTA) são aplicados para preservar material genético de amostras biológicas e tem sido estudados como alternativa para o monitoramento viral em *Aedes* spp. Portanto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o uso de cartão FTA na coleta da saliva e excretas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* infectados para a detecção de ZIKV em condições de laboratório. Para avaliação da detecção de ZIKV a partir de saliva e excretas, os mosquitos foram infectados artificialmente com sangue contendo cultura de ZIKV e separados em potes contendo grupos de 1, 3 e 5 espécimes. Cada pote continha um cartão para a coleta das excretas e os mosquitos foram colocados em contato com cartões FTA impregnados com uma solução a 10% de mel de manuka por 48 h para a liberação de saliva, 14 dias após a alimentação sanguínea. Posteriormente, os cartões contendo saliva e excretas, foram submetidos a análises moleculares para identificação de material genético viral. Os resultados demonstraram que foi possível armazenar e identificar material genético viral após 15 dias de preservação no cartão de amostras provenientes da saliva e das excretas extraídos a partir da utilização de kit comercial. Também foi possível detectar RNA viral provenientes de saliva de mosquitos infectados com ZIKV a partir do cartão, mostrando a capacidade de armazenamento e preservação do RNA viral mesmo em quantidades reduzidas. As análises das excretas em cartões mostraram ser um método sensível para a detecção de RNA viral. Acredita-se que essa técnica facilitará o processo de coleta e preservação do material genético, a detecção e monitoramento viral em condições de campo, permitindo uma estimativa do risco de transmissão.

Palavras-chave: Parasitologia, *Aedes*, Preservação de Amostras, *Zika virus*, RNA Viral, FTA Card.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that has been causing worldwide concern since the major outbreaks that occurred in Brazil and worldwide. In 2015, with the entry of the virus in Brazil, numerous cases of ZIKV-associated congenital syndrome (microcephaly) were registered. At present, there is no vaccine available for ZIKV and for this reason the only way to prevent the disease is vector control. Currently, traps to capture adult vectors are used as a method for monitoring insect populations and the subsequent analysis of the genetic material of these vectors is used as viral monitoring. The Flinders Technology Associates (FTA) cards are applied to preserve genetic material from biological samples and have been studied as an alternative for viral monitoring in *Aedes spp.* Therefore, the present study aimed to evaluate the use of FTA card in the collection of saliva and excreta from *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* infected for ZIKV detection under laboratory conditions. For evaluation of ZIKV detection from saliva and excreta, mosquitoes were artificially infected with blood containing ZIKV culture and separated into pots containing groups of 1, 3 and 5 specimens. Each pot contained a card for collection of excreta and mosquitoes were placed in contact with FTA cards impregnated with a 10% solution of manuka honey for 48 h for saliva release, 14 days after blood feeding. Subsequently, cards containing saliva and excreta were subjected to molecular analysis to identify viral genetic material. The results showed that it was possible to store and identify viral genetic material after 15 days of preservation in the card of samples from saliva and excreta extracted using a commercial kit. It was also possible to detect viral RNA from saliva of ZIKV-infected mosquitoes from the card, showing the ability to store and preserve viral RNA even in small amounts. The excreta analysis in cards has been shown to be a sensitive method for detection of viral RNA. It is believed that this technique will facilitate the process of collection and preservation of genetic material, detection and viral monitoring under field conditions, allowing an estimation of the risk of transmission.

Keywords: Parasitology, *Aedes*, Sample Preservation, *Zika virus*, Viral RNA, FTA Card.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição espacial dos municípios com casos suspeitos de microcefalia no Brasil em 2015. Fonte: Ministério da Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde. 18
- Figura 2.** Esquema do mapa genômico de Zika vírus. Fonte: Adaptado de https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species 19
- Figura 3.** Árvore filogenética de Isolados de ZIKV identificados Guatemala e Porto Rico em dezembro de 2015 comparado com isolados de referência obtidos do GenBank, demonstrando três linhagens diferentes de ZIKV, sendo uma do leste africano, outra ao oeste e a terceira é uma cepa asiática. Fonte: Adaptado de Lanciotti et al. (2016). 20
- Figura 4.** Ciclo Silvestre e ciclo urbano do ZIKV. Fonte: Adaptado de Petersen et al. (2016). 22
- Figura 5.** Mapa global da distribuição prevista de *Ae. aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência desta espécie. As áreas em vermelho indicam a presença de *Ae. aegypti* com alta incidência. Já as áreas em azul estão livres do inseto. Fonte: (Kraemer et al. 2015) 24
- Figura 6.** Mapa global da distribuição prevista para *Ae. albopictus*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência dessa espécie. As áreas em vermelho indicam a presença de *Ae. albopictus* com alta incidência, enquanto que as áreas em azul estão livres do inseto. Fonte: (Kraemer et al. 2015). 25
- Figura 7.** Ciclo de *Aedes spp.* As numerações indicam as fases de vida do inseto sendo: (1) ovos, fase aquáticas (2) os quatro estádios larvais, (3) pupa, fase terrestre: adulto (4). 26
- Figura 8.** *Ae. aegypti* (A). *Ae. albopictus* (B) 27
- Figura 9.** Ciclo de infecção de flavivírus no hospedeiro invertebrado. Fonte: (Carneiro 2014). 28

Figura 10. Esquema da tecnologia de monitoramento do *Ae. aegypti* pelo MI-Dengue. 1 armadilha de captura MosquiTRAP. 2 Dispositivo móvel e 3 sistema online para a gestão dos dados enviados. Fonte: <http://combateadenguesaomateus.blogspot.com/2017/07/mi-aedes-monitoramento-inteligente-de.html> 32

Figura 11. Armadilha Gravid *Aedes* Trap (GAT) que captura fêmeas grávida de *Aedes*. Fonte: <https://eu.biogents.com/bg-gat-for-homeowners/> 33

Figura 12. Cartão FTA utilizado para a deposição de matéria biológica para posteriores análises moleculares clássicas e para a presença de patógenos. 36

Figura 13. (A) Pote plástico modificado utilizado para o acondicionamento dos insetos durante os experimentos para avaliar a alimentação a base de açúcar. (B). Tampa de acrílico de 4 g utilizado como suporte para o cartão FTA juntamente com o algodão embebido em solução. 42

Figura 14. Potes contendo mosquitos em contato com cartão FTA® embebidos em diferentes tipos de soluções de glicose e corantes azul, verde e vermelho. 43

Figura 15. Sistema de alimentação artificial utilizado para infecção dos insetos. 46

Figura 16. (A) Fêmeas ingurgitadas e anestesiadas após repasto sanguíneo contendo partículas de Zika. (B) Cartão FTA® de 6 cm² colocado ao fundo do pote com rampa para coleta de excretas. 47

Figura 17. Mosquitos infectados com ZIKV em contato com cartão FTA após 14 dias da alimentação infectiva. 48

Figura 18. Avaliação da média (desvio padrão) de mosquitos alimentados, não alimentados e mortos por tipo de solução a base de mel de Manuka, mel nacional e sacarose. A avaliação não mostrou diferença estatística entre os tratamentos (Two Way Anova, $P > 0,05$). 50

Figura 19. Avaliação da média (desvio padrão) de mosquitos alimentados, não alimentados e mortos por cor de corante. A avaliação não mostrou diferença estatística entre os tratamentos (Two Way Anova, $P > 0,05$). 51

Figura 20. Mosquitos com abdômen ingurgitado com soluções a base de glicose contendo corante de diferentes cores. Da esquerda para a direita primeiro foi o corante azul, segundo o amarelo e terceiro o vermelho. 52

Figura 21. Curva de diluição seriada de concentrações virais aplicadas aos cartões FTA.. Número médio (desvio padrão) de cópias de RNA viral total obtidos mostrando o limite de detecção de material genético viral preservados no cartão FTA em condições de laboratório. 53

Figura 22. Gráfico de dispersão das concentrações de RNA de ZIKV obtidos nas amostras de cartões FTA contendo saliva de *Ae. aegypti* na primeira e na segunda infecção para os 3 grupos testados. Teste não paramétrico Mann-Whitney (* = $P < 0,05$) 55

Figura 23. Gráfico de dispersão mostrando as concentrações de RNA de ZIKV das amostras de cartões FTA contendo saliva de *Ae. albopictus*, na primeira e segunda infecções. ns = não significativo Mann-Whitney. 56

Figura 24. Observação da coloração das excretas dos mosquitos nos cartões FTA colocado no fundo dos potes plásticos. O detalhe mostra a presença de sangue digerido (pontos mais escuros) e excretas coloridas pelo corante verde presente na solução de mel a qual o cartão FTA estava embebido para a salivação. 57

Figura 25. Gráfico de dispersão mostrando as concentrações de material genético de ZIKV nas amostras de cartões FTA contendo excretas de *Ae. aegypti*. Na primeira e segunda infecções. Mann-Whitney * = $p < 0,05$ 58

Figura 26. Gráfico de dispersão mostrando as concentrações de material genético de ZIKV nas amostras de cartões FTA contendo excretas de *Ae. albopictus* na primeira e segunda infecções. Mann-Whitney * = $p < 0,05$ 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers e sondas utilizados para detecção de ZIKV descritos por Lanciotti 2008 45

Tabela 2. Concentrações das infecções realizadas com ZIKV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. 45

Tabela 3. Número de cabeças e tórax positivas e negativas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* obtidos nas duas infecções respectivamente (N=15 em cada grupo). 54

LISTA DE ABREVIACÕES

BFV	<i>Barmah Forest virus</i>
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
PNH	Primatas não humanos
DENV	<i>Dengue vírus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever vírus</i>
DPI	Dias pós infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FTA	Flinders Technology Associates
GAT	Gravida <i>Aedes</i> Trap
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Lintec	Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores
MI-Dengue	Monitoramento Inteligente da Dengue
MI- <i>Aedes</i>	Monitoramento Inteligente do <i>Aedes</i>
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
NB2	Nível de Biossegurança 2
PFU	Unidades Formadoras de Placa
RNA	Ácido Ribonucleico
RRV	<i>Ross River virus</i>

RT-qPCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SMACK	Sentinel Mosquito Arbovirus Capture Kit
SIT	Sterile Insect Technique
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

1.	Introdução	17
1.1	Epidemiologia e distribuição do <i>Zika virus</i> (ZIKV)	17
1.2	Características do ZIKV	18
1.3	Transmissão do ZIKV	20
1.4	Isolamento do ZIKV em insetos	21
1.5	Vetores de ZIKV no Brasil	22
1.5.1	<i>Aedes aegypti</i>	23
1.5.2	<i>Aedes albopictus</i>	24
1.5.3	Biologia do <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	25
1.6	Ciclo de multiplicação do ZIKV	27
1.7	Métodos de controle de vetor	29
1.8	Monitoramento da circulação de vírus através da análise do inseto vetor	33
1.9	Cartão FTA	35
2.	Justificativa	38
3.	Objetivos	40
3.1.	Geral	40
3.2.	Específicos	40
4.	Material e Métodos	41
4.1	Colaboração	41
4.2	Insetos utilizados nos experimentos	41
4.3	Avaliação da alimentação de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> com o cartão FTA	41
4.4	Teste de sensibilidade de detecção de RNA viral no cartão FTA	43
4.5	Infecção artificial por alimentação oral de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> com ZIKV	45
.....		45

4.6	Avaliação da infecção/disseminação	48
4.7	Processamento dos cartões	49
4.8	Análises estatísticas	49
5.	Resultados	50
5.1	Avaliação da alimentação de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> com o cartão FTA	50
5.2	Teste de sensibilidade de detecção de RNA viral em Cartão FTA	52
5.3	Avaliação da taxa de infecção	53
5.4	Avaliação da detecção de ZIKV proveniente da salivação de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> no cartão FTA	54
5.5	Avaliação da presença de ZIKV nos cartões FTA contendo excreta de mosquitos	57
6.	Discussão	60
7.	Conclusões	65
8.	Considerações finais	66
9.	Referências Bibliográficas	68

1. Introdução

1.1 Epidemiologia e distribuição do *Zika virus* (ZIKV)

Em 1947, o *Zika virus* (ZIKV) foi descoberto em macaco Rhesus durante um estudo sobre febre amarela na Floresta de Zika em Uganda (Dick et al. 1952). Apesar do descobrimento do vírus ter sido em 1947, a primeira descrição do isolamento de ZIKV em humanos ocorreu apenas no ano de 1953 na Nigéria (MacNamara 1954).

Posteriormente, casos de ZIKV só foram registrados na Ásia entre 1977 e 1978 (Olson et al. 1981). Até o ano de 2007, apenas 14 casos da doença haviam sido relatados no mundo. Entretanto, no mesmo ano ocorreu o primeiro surto significativo de Zika na Micronésia, no qual 49 casos da doença foram confirmados (Duffy et al. 2009).

Em 2013, outro surto de maior relevância foi registrado na Polinésia Francesa com cerca de 19.000 casos prováveis da doença, destes apenas 584 pacientes tiveram o soro testado para ZIKV e destes 294 casos foram confirmados (Cao-Lormeau et al. 2016).

No Brasil, os primeiros casos confirmados de Zika foram registrados no início de 2015 nos estados do Rio Grande do Norte e Bahia (Campos et al. 2015; Zanluca et al. 2015). Até o final deste mesmo ano foram notificados mais de 1,4 milhões de casos prováveis da doença em todo país. Nos anos seguintes foram registradas reduções no número de casos prováveis da doença, sendo de 216.207 casos em 2016, 17.593 em 2017 e 8.680 casos em 2018 (SVS 2018). Apesar da diminuição dos casos prováveis da doença, foram registrados óbitos por ZIKV no país.

A doença causada pelo ZIKV possui uma sintomatologia mais branda comparada aos sinais e sintomas causados pelo *Dengue virus* (DENV) e estima-se que 80% dos casos sejam assintomáticos (Duffy et al. 2009). Na maioria dos casos sintomáticos a doença apresenta um quadro clínico brando marcado por dor de cabeça leve, febre de curta duração e acompanhada de erupções cutâneas na pele (Filipe et al. 1973; Simpson 1964). Em alguns casos foram observados outros sintomas como mialgia, vômitos, diarreia, constipação, dor abdominal, tontura e conjuntivite (Lanciotti et al. 2008; Olson et al. 1981; Zanluca et al. 2015).

Apesar dos sintomas serem brandos, a grande preocupação com a doença surgiu com a descoberta de que a infecção por ZIKV em gestantes, principalmente no primeiro trimestre, estava associada a quadros de microcefalia fetal, onde os bebês apresentavam redução na circunferência encefálica e complicações neurológicas. No período do final de 2015 e início

de 2016, o número de bebês que apresentaram má formação congênita foi o maior registrado no mundo (Araújo et al. 2016; Cauchemez et al. 2016; Mlakar et al. 2016). O Ministério da Saúde do Brasil divulgou que em 2015 foram registrados quase três mil casos de microcefalia espalhados pelo país, e acredita-se estar ligada a infecção pelo ZIKV (Fig.1). Atualmente, essa série de complicações observadas em bebês por causa do ZIKV é denominada como Síndrome Congênita do Zika. A infecção por ZIKV pode desencadear quadros neurológicos em adultos que vai desde uma paralisia branda até debilidade total dos membros, e estes quadros são classificados como Síndrome de Guillain-Barré (Araujo et al. 2016; Cao-Lormeau et al. 2016).

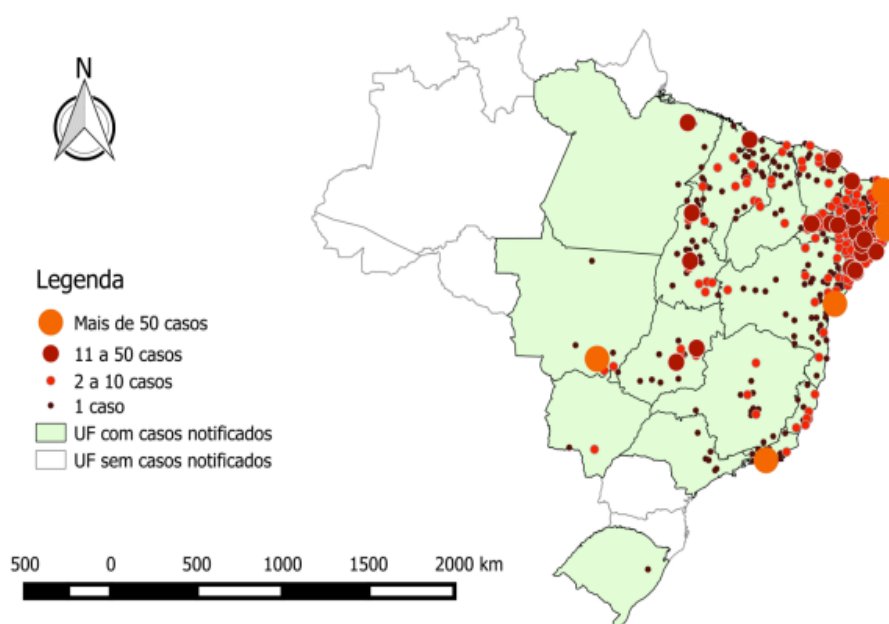


Figura SEQ Figura * ARABIC 1. Distribuição espacial dos municípios com casos suspeitos de microcefalia no Brasil em 2015. Fonte: Ministério da Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde.

1.2 Características do ZIKV

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae*, assim como *West Nile virus* (WNV), *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV) e. O ZIKV possui uma cadeia positiva de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples com cerca de 11 mil pares de base (Kuno e Chang 2007) que codifica uma poliproteína com três proteínas estruturais: capsídeo, premembrana e envelope (incluindo o glicosilação do envelope-154 anteriormente associado à virulência) e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Fig.2). A

transcrição do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) acontece no citoplasma celular (Baronti et al. 2014).

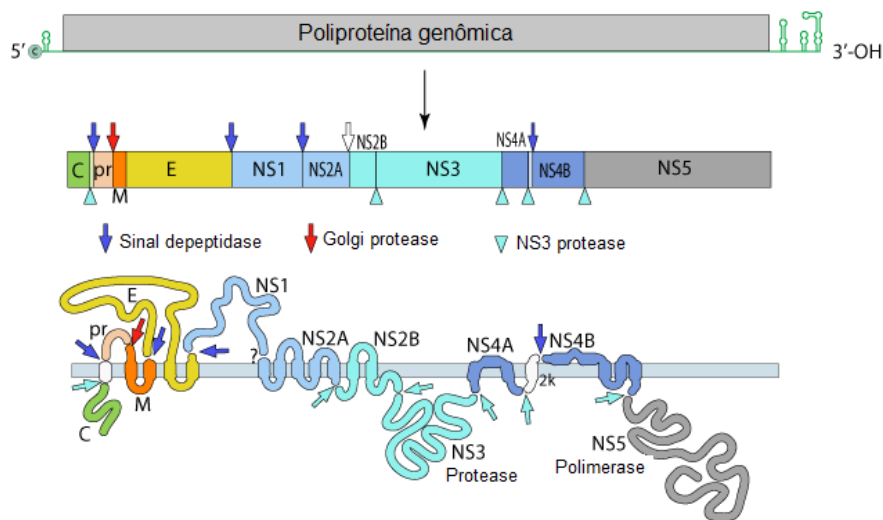


Figura 2. Esquema do mapa genômico de Zika vírus. Fonte: Adaptado de https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species

O vírus faz parte do sorogruppo de Spondweni, cujo ciclo de transmissão principal é através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (Faye et al. 2014).

O sequenciamento do genoma de ZIKV, especificamente da região codificadora NS5, revelou a existência de três linhagens diferentes de ZIKV. Das linhagens existentes, uma pertence ao leste africano (cepas de Uganda), outra ao oeste africano (cepas do Senegal) e a terceira é uma cepa asiática (Fig.3) (Lanciotti et al. 2008). Acredita-se que o vírus originou-se na África Oriental e depois se espalhou para a África Ocidental e Ásia entre 50 a 100 anos atrás (Faye et al. 2014). As cepas presentes no Brasil e em outros locais da América, são provenientes da cepa asiática, essa cepa encontrada na América mostrou mais de 99% de compatibilidade com a cepa da Polinésia Francesa (Lanciotti et al. 2016).

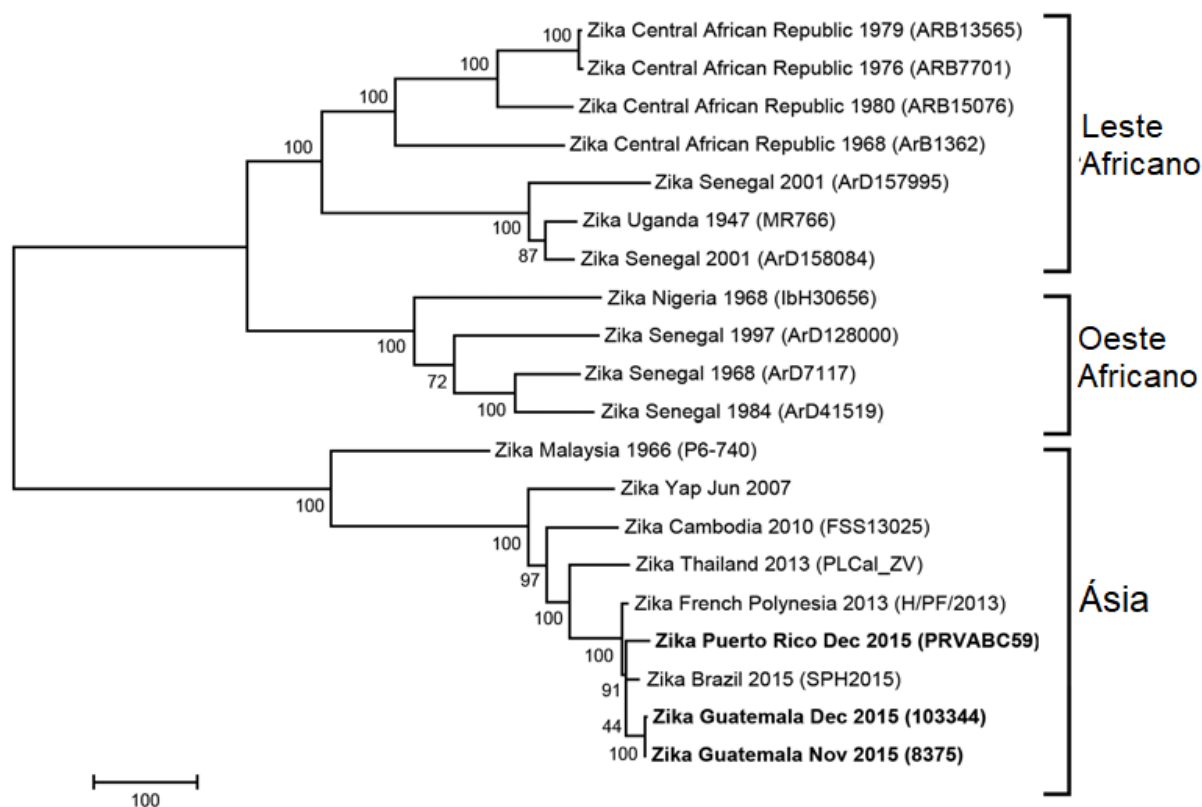


Figura 3. Árvore filogenética de Isolados de ZIKV identificados Guatemala e Porto Rico em dezembro de 2015 comparado com isolados de referência obtidos do GenBank, demonstrando três linhagens diferentes de ZIKV, sendo uma do leste africano, outra ao oeste e a terceira é uma cepa asiática. Fonte: Adaptado de Lanciotti et al. (2016).

1.3 Transmissão do ZIKV

Apesar da principal via de transmissão do ZIKV ser através da picada de insetos vetores do gênero *Aedes* já foi descrito, em condições de laboratório, uma possível participação do gênero *Culex* com capacidade de transmissão (Amraoui et al. 2016; Guedes et al. 2017; Guo et al. 2016). Outros trabalhos mostraram que *Culex quinquefasciatus* do Rio de Janeiro e da província de Guangdong na China, quando desafiados ao ZIKV não apresentaram infecção viral (Fernandes et al. 2016; Liu et al. 2017). Por este motivo, ainda não existe um consenso sobre essa capacidade de transmissão por mosquitos das espécies de *Culex* spp. Além da transmissão vetorial, outras vias de transmissão já foram relatadas como a sexual, demonstrado tanto em modelos animais quanto estudos de casos humanos (Duggal et al. 2017; Foy et al. 2011; Frank et al. 2016; McCarthy 2016; Musso et al. 2015), transmissão

perinatal da mãe para o filho no momento do parto (Besnard et al. 2014) e através de transfusão de sangue (Marano et al. 2016; Musso et al. 2014).

1.4 Isolamento do ZIKV em insetos

O ZIKV foi isolado primeiramente de mosquito da espécie *Aedes africanus* (Dick, Kitchen, e Haddock 1952). Logo após o vírus também foi isolado de vetores das espécies *Ae. aegypti*, *Aedes luteocephalia*, *Aedes furcifer* e *Aedes taylori* (Diallo et al. 2014; Lee e Moore 1972; Marchette et al. 1969).

O ZIKV possui dois ciclos de transmissão: o ciclo silvestre e o ciclo urbano (Fig. 4). O ciclo silvestre envolve Primatas Não Humanos (PNH). Na África, as principais espécies envolvidas nesse ciclo são: *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. taylori* e *Ae. furcifer* (Berthet et al. 2014; Diallo et al. 2014; Dick et al. 1952; Fagbami 1979; Haddock et al. 1964).

No Brasil, PNH infectados pelo vírus foram detectados nos estados de São Paulo e Minas Gerais, sugerindo que havia um ciclo silvestre. Entretanto, não foram detectados mosquitos silvestres infectados pelo vírus (Terzian et al. 2018).

No ciclo urbano ocorre a participação do homem e os principais vetores envolvidos são o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* (Chouin-Carneiro et al. 2016; Marchette et al. 1969; Olson et al. 1981; Weger-Lucarelli et al. 2016; Wong et al. 2013). Outras espécies de mosquitos também foram encontradas infectados pelo vírus como: *Aedes hensilli* e *Aedes polynesiensis*. Portanto, estes podem ser os possíveis vetores dos surtos da Micronésia (Ledermann et al. 2014) e Polinésia Francesa (Musso et al. 2014), respectivamente.

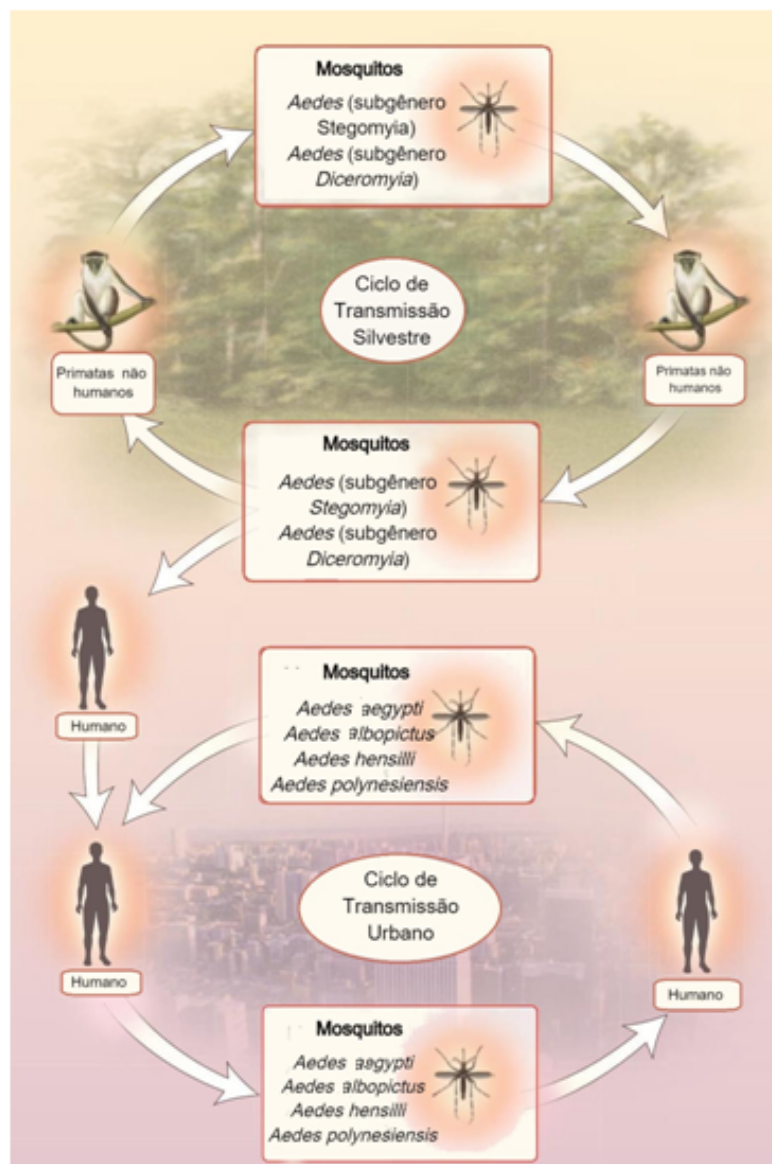


Figura 4. Ciclo Silvestre e ciclo urbano do ZIKV. Fonte: Adaptado de Petersen et al. (2016).

1.5 Vetores de ZIKV no Brasil

Até o momento vários estudos em laboratório de competência vetorial do ZIKV já foram realizados, desses estudos, cinco espécies de mosquitos já se mostraram competentes para a transmissão do ZIKV, sendo elas *Ae. aegypti*, *Ae. africanus*, *Ae. albopictus*, *Ae. hensilli* e *Ae. vexans*, outras treze espécies dentro dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Mansonia* foram classificadas como potenciais vetores do vírus (Benelli e Romano 2017). Dentre as espécies vetoras o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* se destacam como as principais vetoras do ZIKV (Chouin-Carneiro et al. 2016; Liu et al. 2017; Musso e Gubler 2016).

1.5.1 *Aedes aegypti*

No Brasil, a transmissão do ZIKV no ciclo urbano o principal vetor é o *Ae. aegypti*. Este inseto é originário da região afro tropical (Forattini, 2002), e provavelmente chegou ao Brasil durante a colonização e navios com escravos originados da África (Eiras, 2005).

O *Ae. aegypti* encontrou no Brasil condições favoráveis à sua rápida distribuição por quase toda a região tropical do país devido à urbanização acelerada e a sua capacidade de adaptação a novos ambientes. É importante ressaltar que o *Ae. aegypti* também é a principal espécie vetora de outras arboviroses como dengue, chikungunya, febre amarela, entre outras arboviroses, dando a ele uma maior importância epidemiológica (Souza-Neto et al. 2018).

O mosquito é considerado cosmopolita, pois se encontra presente em grande parte do mundo. Um estudo realizado por um grupo de pesquisadores do Reino Unido mostrou que a distribuição do *Ae. aegypti* concentra-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (Kraemer et al. 2015). No Brasil, esta espécie está difundida em todo o país, assim como na América do Sul, exceto na Cordilheira dos Andes e Sul da Argentina. Na América Central está presente em quase todos os países, enquanto que na América do Norte há uma distribuição pequena, estando presente apenas na região banhada pelo Golfo do México e os estados do Texas, Luisiana, Mississippi, Alabama, Geórgia, Carolina do Sul, Carolina do Norte e Flórida nos Estados Unidos, assim como no litoral do México. Na África sua distribuição é ampla, concentrado principalmente na região subsaariana. O *Ae. aegypti* também é encontrado no sudeste da Ásia principalmente na Índia, Bangladesh, Myanmar, Tailândia, Cambodja, Vietnã e Ilhas do Pacífico. Na Oceania, principalmente na Austrália o *Ae. aegypti* mostra uma distribuição geográfica concentrada ao norte do país como pode ser observado na Figura 5 (Kraemer et al. 2015).. E, na Europa, existe presença do inseto em menor quantidade ainda, aparecendo apenas na Espanha e Grécia.

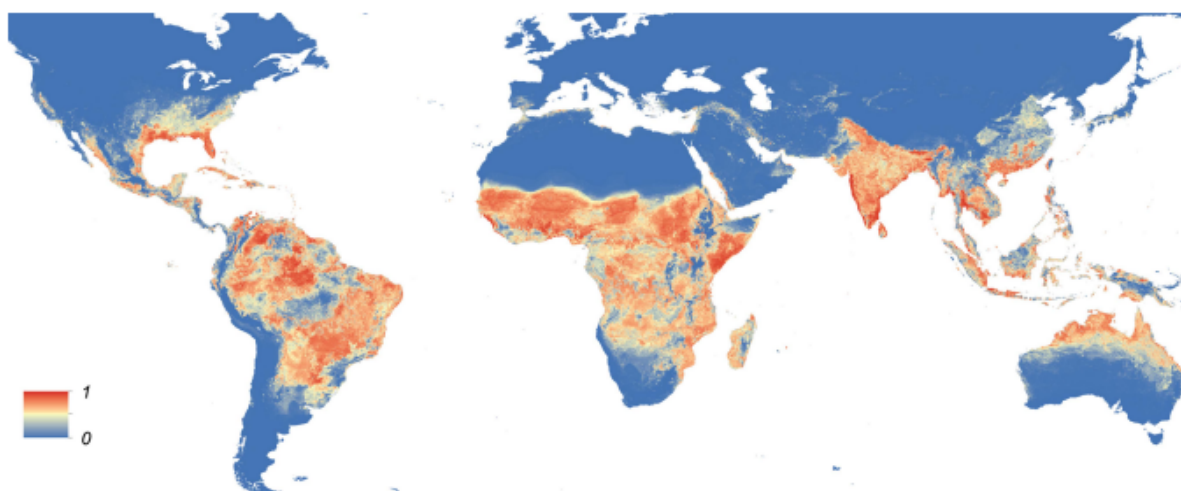


Figura 5. Mapa global da distribuição prevista de *Ae. aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência desta espécie. As áreas em vermelho indicam a presença de *Ae. aegypti* com alta incidência. Já as áreas em azul estão livres do inseto. Fonte: (Kraemer et al. 2015)

1.5.2 *Aedes albopictus*

O *Ae. albopictus*, apesar de ter um papel secundário na transmissão do ZIKV, pode ter grande importância na transmissão dessa arbovirose no país. Esta espécie foi originalmente descrita na Índia e detectado pela primeira vez no Brasil em 1986 nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, simultaneamente (Eiras, 2005).

Acredita-se que o inseto tenha entrado no Brasil através de portos no Espírito Santo, uma vez que a população (linhagem) desse mosquito existente em nosso país parece ser originária do Japão, para onde foi exportada grande quantidade de ferro através dos portos do Espírito Santo. Outro fato que reforça essa hipótese é a diferença biológica em relação à linhagem invasora da América do Norte (Consoli & Oliveira, 1994).

Diferente do *Ae. aegypti*, a distribuição de *Ae. albopictus* estende-se também para regiões mais subtropicais e no Brasil a maior distribuição está na região sul (Kraemer et al. 2015) (Fig.6). Assim como no restante da América do Sul, ele está concentrado na Argentina, Uruguai e Paraguai. Na América Central, o inseto possui pouca distribuição, enquanto que na América do Norte possui grande distribuição no leste e sul dos Estados Unidos estendendo-se a algumas regiões ao norte do país. No continente Africano e Europeu, o inseto possui pouca distribuição. O *Ae. albopictus* também está presente na Ásia e Austrália

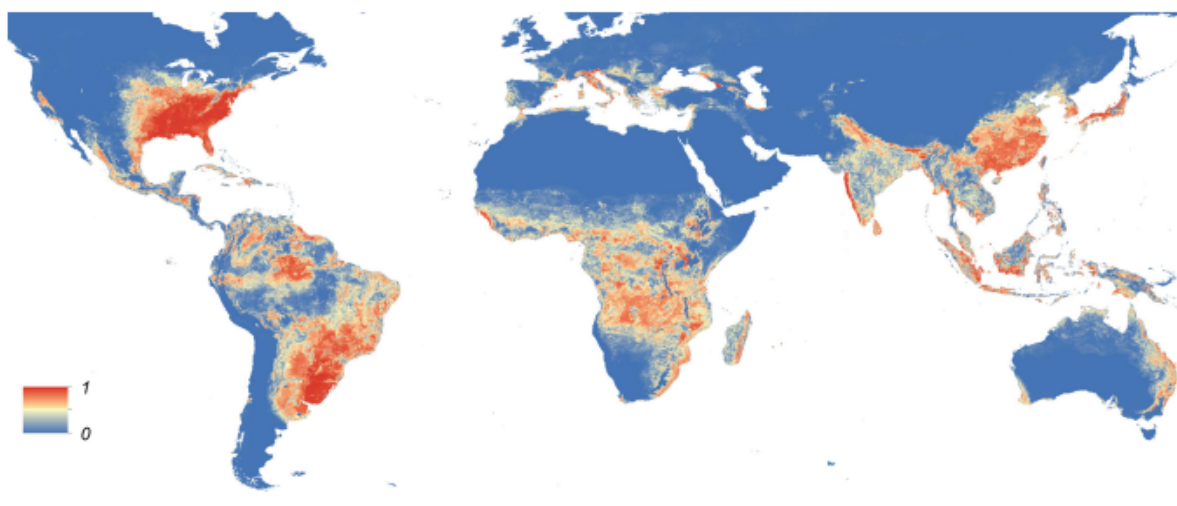


Figura 6. Mapa global da distribuição prevista para *Ae. albopictus*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência dessa espécie. As áreas em vermelho indicam a presença de *Ae. albopictus* com alta incidência, enquanto que as áreas em azul estão livres do inseto. Fonte: (Kraemer et al. 2015).

1.5.3 Biologia do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

As espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* apresentam ciclos de vida semelhantes. Ambos possuem ciclo de vida holometábolo possuindo quatro fases: ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (Forattini 2002) (Fig.7). Os insetos desenvolvem em criadouros contendo água parada que podem ser naturais e artificiais. Os ovos são depositados em sua maioria na parede dos criadouros, próximo à lâmina d'água, onde podem permanecer por um longo período, além disso, os ovos podem ser depositados diretamente na água (de Abreu et al. 2015; Forattini 2002; Rey e O'Connell 2014; Soares et al. 2015; Wermelinger et al. 2015).

Para *Ae. aegypti* existem trabalhos que mostraram ovos viáveis por até oito meses (Soares-Pinheiro et al. 2017). O ciclo biológico de ovo a adulto varia entre 7 a 10 dias em condições ideais de temperatura e umidade (Rey, 2008), e os adultos podem viver por cerca de 30 dias (Freitas e Sylvestre, 2013).

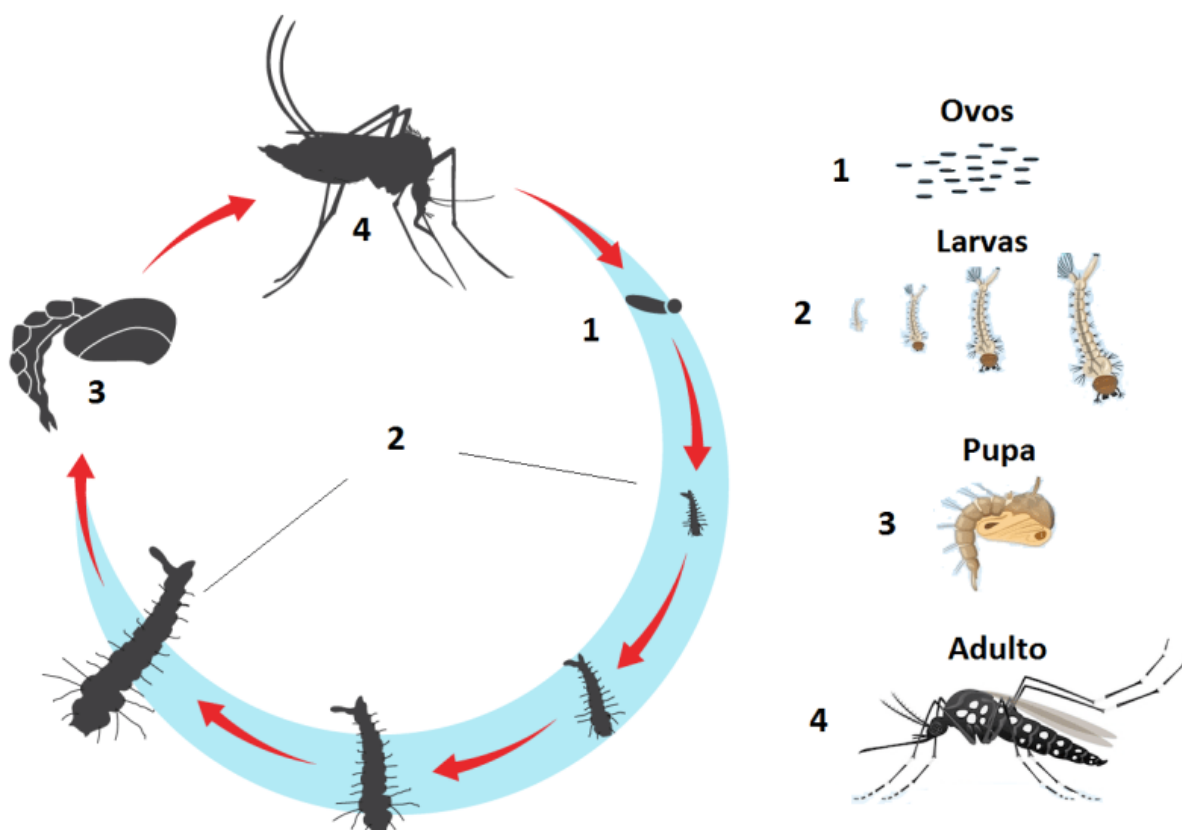


Figura 7. Ciclo de *Aedes spp.* As numerações indicam as fases de vida do inseto sendo: (1) ovos, fase aquáticas (2) os quatro estádios larvais, (3) pupa, fase terrestre: adulto (4).

Fonte <http://www.casadaciencia.com.br/o-fim-da-picada/>

Os mosquitos adultos das espécies de *Ae.aegypti* e *Ae. albopictus* apresentam tórax enegrecido, frequentemente ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras. Os adultos de *Ae. aegypti* têm coloração escura com escamas prateadas, os mosquitos dessa espécie podem apresentar variações de tonalidade entre preto e castanho. O clipeo dessa espécie apresenta escamas prateadas. O tórax possui escamas prateada em formato de lira no dorso (Fig.8 A) (Forattini 2002).

Os mosquitos da espécie *Ae. albopictus*, apresentam coloração preta e escamas prateadas pelo corpo, sem variação de tonalidades. Assim como o corpo do inseto, o clipeo possui cor preta e no dorso do tórax possui uma faixa central longitudinal (Fig.8 B) (Forattini 2002; Consoli & Oliveira 1994).

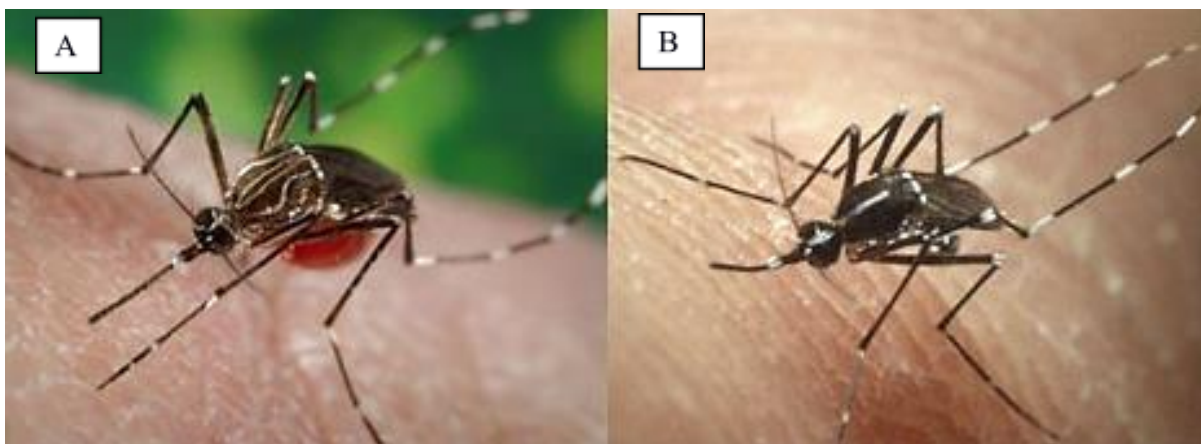


Figura 8. *Ae. aegypti* (A). *Ae. albopictus* (B) Fonte: <https://www.cdc.gov/chikungunya/transmission/index.html>

Esses dois vetores possuem hábitos diurnos, sendo a sua maior atividade hematofágica ao amanhecer e entardecer. Os mosquitos adultos, tanto machos quanto fêmeas, alimentam-se de substâncias açucaradas como frutose, glicose, sacarose. E somente as fêmeas necessitam da alimentação de sangue (Consoli & Oliveira 1994), pois do sangue são obtidos os nutrientes necessários para o desenvolvimento e maturação dos ovos como aminoácidos essenciais (Harrington et al. 2001).

O *Ae. aegypti* é um vetor predominantemente urbano, o inseto utiliza de grande variedade de criadouros artificiais para a reprodução, e se alimenta quase que exclusivamente em humanos (Powell e Tabachnick 2013).

O *Ae. albopictus* é mais frequentemente encontrado em áreas periurbanas e ambientes rurais, alimentando se em uma variedade de espécies de mamíferos incluindo humanos (Delatte et al. 2008). Contudo, atualmente é possível observar que o *Ae. Albopictus* já está presente em grande parte dos centros urbanos (Braks et al. 2003; Gao et al. 2016; Y. Li et al. 2014).

1.6 Ciclo de multiplicação do ZIKV

O processo de infecção e replicação do ZIKV no vetor ainda é pouco conhecido, mas acredita-se ser semelhante a outros flavivirus. A infecção do vetor acontece no momento em que a fêmea do mosquito realiza o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado pelo ZIKV. Ao ser exposto ao vírus, o vetor oferece as condições ideais que permitem a replicação rápida do vírus nas suas células. A replicação ocorre desde o intestino médio até a hemolinfa.

Acredita-se que a proteína E, presente no envelope dos flavivírus é responsável pela entrada dos vírions, partículas infectivas do vírus, nas células do hospedeiro, onde ocorre a fusão de membrana viral com membrana endossômica do hospedeiro (Dai et al. 2016). Dentro da célula, na superfície do retículo endoplasmático, ocorre à replicação viral que passa pelas seguintes etapas: primeiramente ocorre o desnudamento viral, que é a liberação do RNA viral no interior da célula infectada, a proteína C do flavivírus se associa ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo, que se forma no lúmen do retículo endoplasmático para produzir a partícula viral imatura, que é transportada para o complexo de Golgi onde ocorre a maturação das partículas virais. Após essa montagem de um novo vírus e maturação de novos vírions, eles são liberados por exocitose, as novas partículas infectivas serão disseminadas por todo corpo do mosquito via hemolinfa, indo para o corpo gorduroso, músculos, neurônios e glândulas salivares (Black et al. 2002; Dai et al. 2016; Girard, Klingler, and Higgs 2004; Gratz 2004; McElroy et al. 2008; Romoser et al. 2004; Salazar et al. 2007; Yu et al. 2008).

O período extrínseco de incubação dos flavivirus, que é o período entre o mosquito estar infectado e se tornar infectivo, pode variar de 4 a 10 dias. Após este período o mosquito pode ser capaz de transmitir o vírus através da picada a outros indivíduos no momento em que buscar uma nova fonte de alimentação sanguínea (Musso e Gubler 2016) (Fig.9).

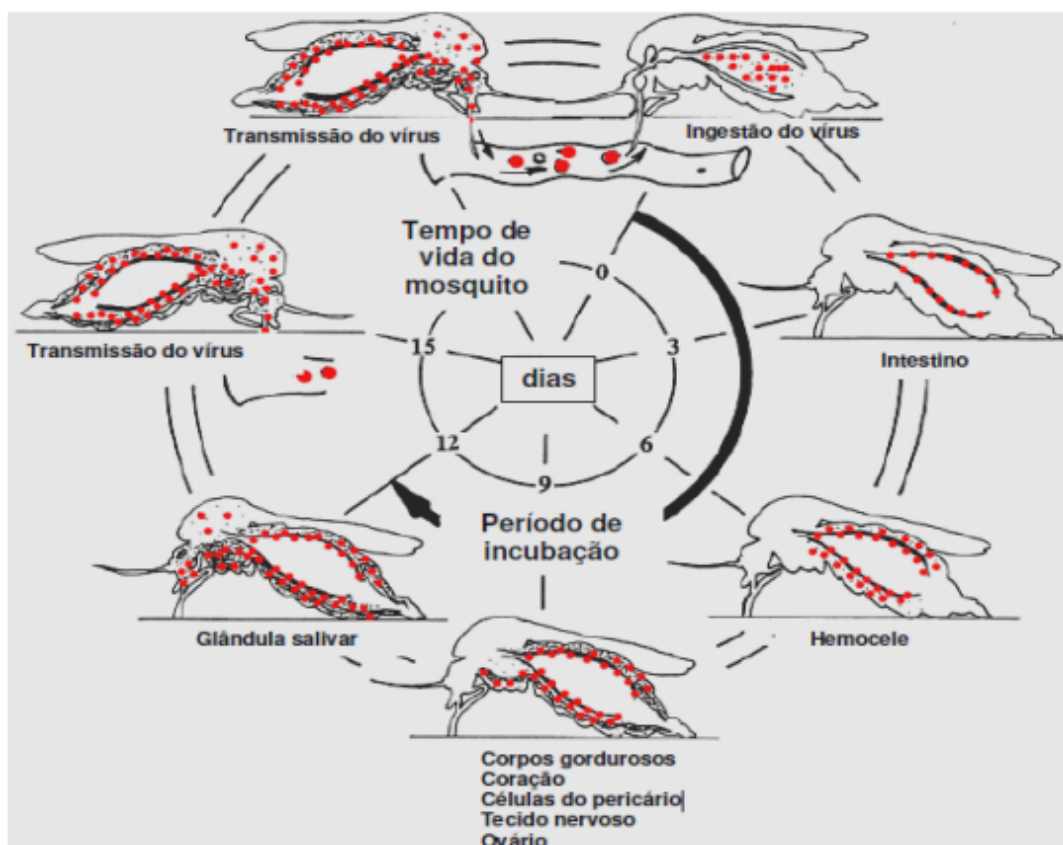


Figura 9. Ciclo de infecção de flavivírus no hospedeiro invertebrado. Fonte: (Carneiro 2014).

1.7 Métodos de controle de vetor

As infecções pelo ZIKV tiveram um aumento significativo nos últimos anos, fazendo com que muitos esforços sejam aplicados para possibilitar o seu combate. Apesar dos grandes avanços no ramo do desenvolvimento de imunobiológicos contra Zika, até o momento, nenhuma vacina foi licenciada para comercialização. Além disso algumas substâncias se mostraram promissoras para o tratamento nas infecções por ZIKV, mas ainda estão em estudos (Batista et al. 2019; Olafuyi e Badhan 2018; Vasireddi et al. 2019), portanto, os tratamentos empregados normalmente baseiam-se no combate aos sintomas sendo recomendado repouso, ingestão de líquidos e medicamentos para dor e febre (Alaniz 2018). Atualmente melhor forma de controle desta arbovirose continua sendo o combate aos vetores do vírus (Petersen et al. 2016; Shan et al. 2016; Slenczka 2016).

As formas de combate ao mosquito vetor do ZIKV são variadas, sendo utilizadas metodologias para o combate dos ovos até o inseto adulto. Entre as formas de controle do vetor, o controle físico que consiste na remoção de criadouros artificiais como pneus, garrafas e recipientes domésticos descartados são de extrema importância (Funasa, 2001). Também são utilizadas muitas estratégias de controle biológico como, por exemplo, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Polanczyk et al. 2003), controle químico com a utilização de inseticidas e uso de armadilhas para captura de vetores adultos. Além disso, novas tecnologias de combate ao vetor para redução da transmissão de arboviroses têm surgido nos últimos anos.

A técnica de esterilização de insetos (*Sterile Insect Technique*, SIT) por irradiação, baseia-se na exposição de mosquitos machos a dose de raios gama ou raios X. A dose de radiação recebida por esses insetos atinge diretamente o seu material genético torna-os estéreis, assim ao copular com fêmeas selvagens, não haverá reprodução, diminuindo a população desses insetos. O acasalamento de machos estéreis liberados com fêmeas selvagens nativas pode levar a uma diminuição do potencial reprodutivo das fêmeas e, assim, contribuir para a eliminação local ou supressão da população de vetores (Alphey et al. 2010; Ferreira et al. 2008; Thomé et al. 2010). A SIT surgiu nos anos 50 para o controle de pragas (Knipling 1959) e em seguida passou a ser testada em campo para o controle de mosquitos vetores principalmente nos Estados Unidos (Fay 1969; Morlan, McCraY e Kilpatrick 1962) e Índia (Grover et al. 1976; Rai et al. 1973). No entanto, estudos utilizando a técnica SIT para o controle de arboviroses não obteve o mesmo sucesso que as pragas agrícolas (Benedict e Robinson 2003; Klassen e Curtis 2005) e tornou-se cada vez menos utilizado após os anos 80 (Lees et al. 2015). A principal dificuldade dessa técnica é a diminuição da capacidade

competitiva desses machos para a cópula quando comparado a machos selvagens, além de uma possível fertilidade residual (Yakob et al. 2008). Entretanto, nos últimos anos, com o crescimento da transmissão de arboviroses, novos estudos tanto em laboratório quanto em campo foram retomados e tem se mostrado bastante promissores (Alphey et al. 2010; Bond et al. 2019; Chung et al. 2018; Oliva et al. 2012).

Outra tecnologia é a produção de mosquitos transgênicos que consiste na modificação genética visando à morte desses insetos e conseqüentemente reduzindo sua população no ambiente. A primeira linhagem desenvolvida foi a OX513A em *Ae. aegypti* onde os machos transgênicos liberados no ambiente ao copularem com fêmeas selvagens produzem uma prole portadora do transgene que morrerá antes de chegar à fase adulta (Bargielowski et al. 2011; Carvalho et al. 2015; Fu et al. 2007; Harris et al. 2011). Outra linhagem transgênica aprimorada foi criada, a OX3604, no qual o gene afeta diretamente o voo das fêmeas. As proles que possuem essa modificação perdem a capacidade de voo, impedindo, portanto, de copular e picar, conseqüentemente não ocorre a transmissão de arboviroses (Fu et al. 2010; Wise de Valdez et al. 2011)

Outra alternativa para o controle da transmissão de ZIKV é a utilização de microorganismos simbiotes que podem manipular o comportamento dos mosquitos, como é o caso da bactéria *Wolbachia*. Esta bactéria é intracelular obrigatória e está presente em cerca de 60% de todas as espécies de insetos, além de ser inofensiva a mamíferos (Hilgenboecker et al. 2008; Jeyaprakash e Hoy 2000). Apesar dessa grande quantidade de insetos que apresentam a simbiose com a *Wolbachia*, mosquitos da espécie *Ae. aegypti* não a possui naturalmente. Estudos em laboratório iniciados na Austrália mostraram que a introdução de *Wolbachia* em embriões desses mosquitos foi transferida para a prole através da transmissão vertical aos descendentes é capaz de diminuir o ciclo de vida do inseto por incompatibilidade citoplasmática (McMeniman et al. 2009; Moreira et al. 2009; Xi, Khoo, e Dobson 2005; Yeap et al. 2011). Diferentemente das metodologias que usam mosquitos irradiados ou transgênicos que soltam apenas machos, para a soltura de mosquitos contendo *Wolbachia* não há a necessidade de seleção, tanto machos quanto fêmeas carregam a bactéria. Estudos com *Wolbachia* em laboratório já demonstraram que foi possível bloquear a transmissão de DENV, *Chikungunya vírus* (CHIKV), YFV e ZIKV (Bian et al. 2010; Dutra et al. 2016; Van den Hurket al. 2012). Acredita-se que haja competição da bactéria com o vírus por recursos celulares e nutricionais, impedindo a replicação e conseqüentemente sua transmissão (Turley et al. 2009). Estudos de campo com a soltura desses mosquitos se iniciaram na Austrália em 2011 e vem expandindo pelo mundo, atualmente estando presente em 12 países (O'Neill et al.

2018). Esses estudos demonstraram que mosquitos da espécie *Ae. aegypti* contendo a *Wolbachia* conseguem espalhar efetivamente em populações selvagens de *Ae. aegypti*, podendo diminuir a transmissão de arboviroses como Dengue e Zika (Dutra et al. 2015; Hoffmann et al. 2014; Nguyen et al. 2015). No Brasil já foram realizadas solturas de mosquitos contendo *Wolbachia* para um projeto piloto no Rio de Janeiro, os resultados demonstraram que a utilização da *Wolbachia* para o controle de arboviroses possui um futuro promissor no país (O'Neill 2018).

Outra estratégia que busca diminuir a transmissão de arboviroses através de monitoramento vetorial é o Monitoramento Inteligente da Dengue (MI-Dengue) (Eiras e Resende 2009). Essa tecnologia consiste em um sistema de informação rápida baseada na utilização de uma armadilha que captura mosquitos adultos principalmente das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Armadilhas são instaladas em peridomicílio e fornecem dados de campo que são documentados e dispostos em um software em tempo real. Através do uso da internet essas informações vão para um banco de dados e podem ser visualizados em mapas georreferenciados. Os dados coletados pelo sistema de monitoramento do vetor são de grande valia para o planejamento de medidas de controle precoces nas áreas com altas infestações de mosquitos adultos. A partir de um estudo realizado em Minas Gerais, foi possível concluir que o MI-Dengue, é uma tecnologia eficiente para a diminuição da incidência de dengue. No estudo as armadilhas foram implantadas em 21 municípios do estado onde havia alta incidência de Dengue, o custo benefício da metodologia foi analisado em comparação as metodologias tradicionalmente usadas pelo governo brasileiro. Os resultados do estudo permitem concluir que a tecnologia se mostrou mais efetiva que metodologias tradicionais, estima-se que através da utilização do MI- Dengue, cerca de 21 mil casos de Dengue foram evitados, além disso, foi observado que a tecnologia possibilita minimizar perdas econômicas relacionados ao tratamento de doentes e perda de produtividade de funcionários doentes, sendo assim uma metodologia com bom custo benefício para os municípios (Pepin et al. 2013) (Fig. 10).



Outra tecnologia que apresentou resultados promissores para o monitoramento e controle do mosquito foi a armadilha *Gravida Aedes Trap* (GAT) (Fig.11). Essa armadilha foi desenvolvida na Universidade de James Cook, Austrália (Eiras et al. 2014) e é específica para fêmeas grávidas de *Aedes sp.* pois possui mecanismos olfativos e visuais de atração de fêmeas grávidas. A utilização da armadilha GAT em comparação com outras armadilhas mostra se uma alternativa para o monitoramento de mosquitos, uma vez que, é de fácil manuseio, baixo custo e não necessita de eletricidade para funcionar (Johnson et al. 2016). Os mosquitos adultos capturados na GAT também podem ser utilizados para a detecção viral e com isso é possível realizar o monitoramento da circulação de arbovírus (Eiras et al. 2018). Um estudo inicial foi realizado no município de Piumhi em Minas Gerais para avaliar a eficiência da GAT, e o resultado obtido foi satisfatório na redução dos índices entomológicos através de coleta massal, indicando a possibilidade do seu uso associado aos programas de controle de vetores (Motta 2018).



Figura 11. Armadilha Gravid *Aedes* Trap (GAT) que captura fêmeas grávida de *Aedes*.

Fonte: <https://eu.biogents.com/bg-gat-for-homeowners/>

1.8 Monitoramento da circulação de vírus através da análise do inseto vetor

Uma forma mais robusta para o monitoramento vetorial e viral seria a associação do sistema de monitoramento da densidade de mosquitos utilizando armadilhas ao diagnóstico molecular do RNA viral nestes insetos. O cruzamento dos dados sobre a densidade vetorial, bem como a presença de vírus nos mosquitos, possibilitaria aos órgãos públicos de saúde atuarem de forma mais rápida no controle vetorial e conseqüentemente reduzir a transmissão de arboviroses.

A detecção de RNA viral através da metodologia de “*Real Time Polymerase Chain Reaction*” (RT-qPCR) tem se mostrado uma opção, pois trata-se de uma metodologia rápida, sensível e específica para a detecção de ZIKV (Faye et al. 2013; Lanciotti et al. 2008; Xu et al. 2016), e outras arboviroses como Dengue (Chien et al. 2006; Gurukumar et al. 2009; Leparç-Goffart et al. 2009) e chikungunya (Carletti et al. 2007; Parida et al. 2007).

Alguns estudos demonstraram a eficiência da metodologia de diagnóstico molecular através da RT-qPCR em associação a uma variedade de armadilhas para captura de mosquitos vetores. Nos Estados Unidos, a metodologia foi utilizada para detecção de WNV em mosquitos coletados nas armadilhas BG-Sentinel e CDC (Farajollahi et al. 2009), enquanto que no Brasil, estudos realizados com as armadilhas BG-Sentinel e Mosquitrap, possibilitaram a detecção de DENV nas populações de mosquitos analisadas (Figueiredo et al. 2013; Vilela et al. 2010). Recentemente, a armadilha GAT permitiu identificar grupos de mosquitos capturados que estavam infectados com DENV e ZIKV (Eiras et al. 2018).

Após a entrada de ZIKV e CHIKV no país, o MI-Dengue passou a se chamar Monitoramento Inteligente do *Aedes* (MI-*Aedes*®) e começou a ser amplamente utilizada para o monitoramento viral, uma vez que associa captura de culicídeos através do uso de armadilhas e o diagnóstico molecular. A tecnologia detecta DENV, ZIKV e CHIKV diretamente dos mosquitos coletados nas armadilhas através de RT-qPCR (Sedda et al. 2018). A associação das metodologias permite priorizar o combate ao vetor nas áreas com maior circulação viral, diminuindo o risco de transmissão de arbovírus.

Recentemente, uma forma indireta de monitoramento viral através da análise vetorial explora o processo de hematofagia dos mosquitos que liberam os vírus presentes na saliva durante a alimentação açucarada. (Doggett et al. 2001; van den Hurk et al. 2007). Em laboratório, a saliva de mosquitos previamente infectados pelo WNV, foi coletada em papel filtro contendo solução açucarada como atrativo e então foi detectado em análises de RT-qPCR. Em condições de campo, tiras de papel filtro com solução açucarada foram colocados próximos a animais sentinelas e análises posteriores também permitiram a detecção viral (Lothrop et al. 2012).

Na Austrália, estudos aprimoraram a forma de coleta e preservação de material biológico. Neste sistema, os mosquitos foram atraídos para as armadilhas contendo iscas atrativas e internamente foi colocado um cartão do tipo FTA (Flinders Technology Associates) (GE Whatman International Ltd., Maidstone, Reino Unido) que tem como principal função de preservar o material genético liberado da saliva dos mosquitos infectados. Os resultados indicaram que foi possível detectar material genético viral via RT-qPCR, uma vez que o cartão FTA preservou o material viral por sete dias e possibilitou a identificação de *Ross River virus* (RRV) e *Barmah Forest virus* (BFV) (Hall-Mendelin et al. 2010).

Baseado neste estudo, foi desenvolvido o “*Sentinel Mosquito Arbovirus Capture Kit*” (SMACK), que consiste na utilização de armadilha contendo CO₂ e na parte interna foram colocados cartões FTA embebidos em mel para alimentação dos mosquitos capturados e deposição de possíveis partículas virais no cartão. Os resultados demonstraram que o SMACK pode ser uma ferramenta simples e eficaz de vigilância viral (Johnson et al. 2015).

Além da saliva, outra forma indireta de detecção viral é a análise das excretas de mosquitos para detecção viral de DENV, RRV e WNV onde foi apontado como um método mais sensível que a saliva para a identificação viral (Fontaine et al. 2016; Ramírez et al. 2018). No entanto, a metodologia de análise de excretas não foi descrita para o uso associado a armadilha em campo.

1.9 Cartão FTA

Cartões FTA são papéis de filtro impregnados com uma fórmula química patenteada que é capaz de inativar rapidamente os organismos infecciosos e preservar o material genético. O material químico impregnado no cartão promove a inativação viral e desnatura proteínas, retém e preserva os ácidos nucleicos dentro da matriz das fibras do papel (General Electric Company, 2011). Originalmente este cartão foi desenvolvido para a coleta de amostras de sangue (Figura 12). Este veículo permite o armazenamento e transporte de amostras biológicas com menor possibilidade de acidente com o agente patogênico. Além disso, o cartão FTA contendo material genético pode ser armazenado e transportado à temperatura ambiente, sem a necessidade de condições climatizadas. Esta condição faz com que o custo de transporte de amostras biológicas para o diagnóstico molecular fique viável e acessível. No momento da extração do material contido no papel, os ácidos nucleicos são

recuperados através da eluição com reagentes clássicos como água e Tampão fosfato-salino (PBS).

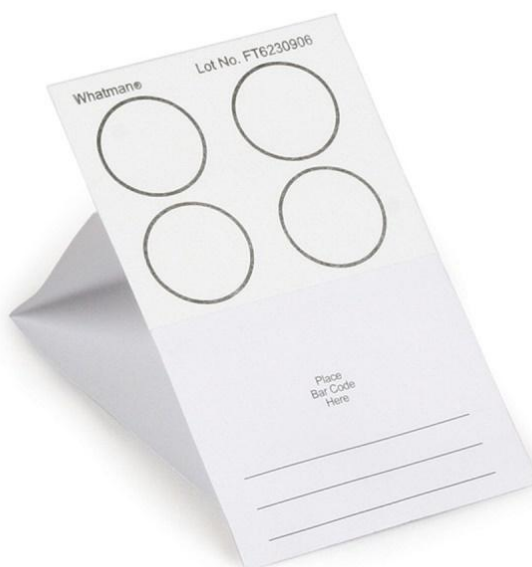


Figura 12. Cartão FTA utilizado para a deposição de matéria biológica para posteriores análises moleculares clássicas e para a presença de patógenos.

Fonte: http://www.tigerofficer.com/Products/FTA-Classic-Card---Pack-of-100__GE-WB120205.aspx

A principal vantagem do cartão FTA é a estabilidade a longo prazo dos ácidos nucleicos que podem chegar a mais de 17 anos (General Electric Company, 2011) à temperatura ambiente e o subsequente armazenamento das amostras fixadas para testes moleculares adicionais. Existem evidências de que os cartões FTA foram capazes de se ligar ao RNA de arbovírus e preservá-lo a 23 °C durante pelo menos 28 dias (Hall-Mendelin et al. 2017).

O cartão FTA é usualmente empregado para armazenamento de amostras de sangue para posterior análise diagnóstica de diversos patógenos como, por exemplo: HIV, *Leishmania*, vírus da raiva entre outros patógenos (Gustavsson et al. 2009; Kato et al. 2011; C. C. Li et al. 2004; Picard-Meyer et al. 2007). Além da utilização da coleta de sangue, foi utilizado para outras finalidades como armazenamento de esfregaço de pele para detecção de *Mycobacterium leprae* (Aye et al. 2011), e para o armazenamento de DNA de sêmen (Fujita e Kubo 2006). Além disso, ele tem mostrado ter uma grande versatilidade e comprovada eficiência para o armazenamento de material genético (Santos 2018).

Hall Mendelin e colaboradores (2017) avaliaram a presença de arbovírus em mosquitos e foi demonstrado ser possível detectar DENV, ZIKV e BFV em mosquitos prensados e armazenados no cartão (Hall-Mendelin et al. 2017). Outros estudos foram realizados utilizando saliva de mosquitos infectados para o monitoramento da circulação e transmissão viral (Flies et al. 2015; Hall-Mendelin et al. 2010; Johnson et al. 2015), comprovaram a detecção do WNV, CHIKV e BFV, entre outros arbovírus. Entretanto, até o momento, não foi demonstrada a eficácia desta metodologia para ZIKV através de saliva e excretas dos insetos vetores.

2. Justificativa

Com a introdução de novos arbovírus como CHIKV em 2013 e o ZIKV em 2015 nas Américas, somados a presença de dengue, já endêmico no Brasil, o controle da transmissão desses arbovírus tem sido uma preocupação constante entre os programas de controle de arboviroses.

A ausência de vacina contra as arboviroses como Zika, além da falta de medicamentos específicos para o tratamento humano contra estes vírus faz do controle vetorial a principal forma de combate a doença. Por esse motivo, várias metodologias de combate ao vetor vêm sendo utilizadas e aprimoradas no intuito de diminuir a transmissão destes vírus.

A maior parte das estratégias, atualmente utilizadas, é baseada no monitoramento e controle das populações de vetores com o uso de armadilhas, associada ao monitoramento da circulação viral. O uso de armadilhas para captura destes insetos e posteriores análises de identificação viral já foi relatado em diversas partes do mundo. O monitoramento viral, no entanto, apresenta algumas limitações uma vez que se baseiam em análise de mosquitos inteiros capturados por armadilhas, o que demanda grande mão de obra e possibilidade de degradação do material genético viral, impossibilitando a sua detecção posteriormente.

Diante da necessidade da implementação de novas técnicas de monitoramento e coleta de material genético viral a partir de mosquitos infectados com arbovírus causadores de dengue, Zika e chikungunya em condições de campo, vem surgindo novas metodologias. Uma nova alternativa, começou a ser estudada utilizando o cartão FTA associado a armadilhas para captura de mosquitos adultos, a modo de possibilitar a detecção viral com maior eficiência a partir da saliva dos vetores. Além disso, a metodologia de utilização do FTA possui a grande vantagem de permitir o armazenamento do material genético viral coletado a partir dos vetores por um longo período de tempo, podendo chegar a mais de 17 anos sem necessitar de uma grande infraestrutura como freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ que é a temperatura ideal para preservação de RNA viral. E finalmente, a análise da saliva permite indicar com mais precisão o risco de transmissão de arboviroses, uma vez que detecta o vírus pela via de transmissão, eliminando assim, amostras positivas de mosquitos que não estejam transmitindo o vírus.

Acredita-se que com a padronização desta metodologia no Brasil, ela poderia ser aplicada ao sistema de monitoramento em campo, agregando a análise da presença viral e permitindo a diminuição da frequência de vistorias das armadilhas, uma vez que impediria a

degradação do material genético viral, facilitando as vistorias em lugares com maior dificuldade de acesso.

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar o uso de cartão FTA na coleta da saliva e excretas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* infectados para a detecção da presença de RNA de ZIKV em condições de laboratório.

3.2. Específicos

- Avaliar a capacidade de alimentação de fêmeas de *Ae. aegypti* no cartão FTA com diferentes soluções açucaradas;
- Avaliar a interferência de diferentes cores de corantes na alimentação de fêmeas de *Ae. aegypti* .
- Avaliar o limite de detecção de partículas de ZIKV no cartão FTA;
- Avaliar a extração de RNA viral nos cartões FTA a partir de kit comercial e metodologia baseada em solução de Tris.
- Identificar a presença de ZIKV eliminados nas salivas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* preservados em cartão FTA;
- Avaliar a presença de ZIKV nas excretas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* preservados no cartão FTA.

4. Material e Métodos

4.1 Colaboração

Os experimentos com infecção viral dos mosquitos foram conduzidos no insetário do grupo de pesquisa Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor do Instituto René Rachou, Fiocruz - Minas Gerais, sob a coordenação do Dr. Luciano Andrade Moreira. O insetário possui certificação Nível de Biossegurança 2 (NB2) junto a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) segundo o parecer 3.277/2012.

4.2 Insetos utilizados nos experimentos

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de colônia do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores (Lintec), do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os insetos foram criados conforme o protocolo de operação do laboratório, sendo assim, o insetário foi mantido em condições controladas de temperatura entre 25 °C a 30 °C, umidade relativa do ar de aproximadamente 60% e fotoperíodo de 12 horas. Na fase aquática, as larvas e pupas foram mantidas em água dechlorada e as larvas foram alimentadas com ração para réptil Reptolife[®]. Ao chegar a fase de pupa os insetos foram separados e colocados para a emergência dos adultos em gaiolas do tipo Bugdorm e os adultos foram alimentadas com solução açucarada a 10%.

As populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* utilizadas nos experimentos foram originárias de amostras coletadas no Campus da UFMG, e foram utilizadas fêmeas de mosquitos da geração F4 com idade entre 5 a 7 dias.

4.3 Avaliação da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* com o cartão FTA

Para avaliar a capacidade de alimentar no cartão FTA foram utilizadas apenas fêmeas da espécie *Ae. aegypti*. Os insetos foram privados de alimentação por 24 horas, exceto água para evitar a dessecação dos insetos. Após este período de jejum, os mosquitos foram

colocados em contato com o cartão, segundo a metodologia descrita por Johnson (2015) com adaptações.

A metodologia consistiu em utilizar potes plásticos de 350 mL para o acondicionamento dos insetos. A parte central das tampas dos potes plásticos foram removidas e substituídas por uma tela de pano do tipo organza. Também foi feito um furo em uma das laterais dos potes para possibilitar a manipulação dos insetos (Fig.13 A). Em cada pote foram colocados 10 insetos e então, por cima das telas foi posicionado um tampa de acrílico de aproximadamente 2 cm² de cabeça para baixo, que continha um recorte de 2 cm² do cartão FTA e algodão na parte inferior embebido em diferentes tipos de soluções a base de glicose, para reduzir a dessecação da solução nos cartões FTA (Fig.13 B).

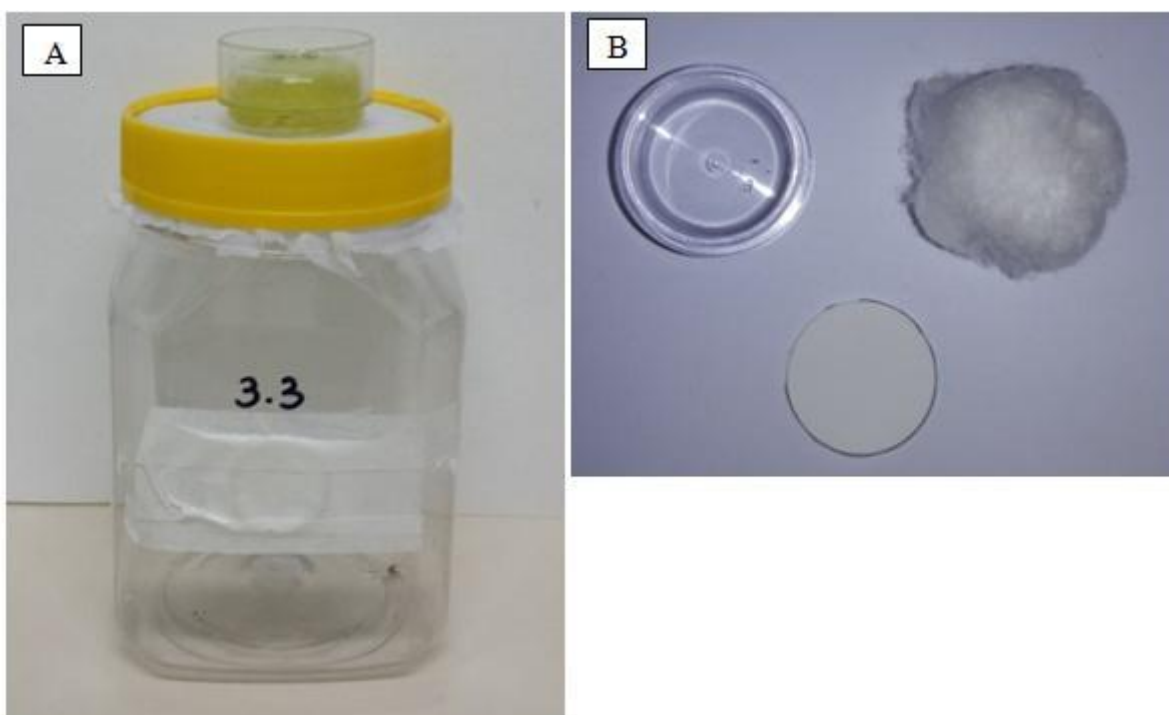


Figura 13. (A) Pote plástico modificado utilizado para o acondicionamento dos insetos durante os experimentos para avaliar a alimentação a base de açúcar. (B). Tampa de acrílico de 4 g utilizado como suporte para o cartão FTA juntamente com o algodão embebido em solução.

Também foram testados diferentes cores de corantes alimentícios com intuito de utilizar aquele que pudesse facilitar a verificação da alimentação e excreção. As soluções utilizadas no estudo foram: solução de mel de Manuka (Pacific International Resources, EUA)

em duas diferentes concentrações (50% e 10%), solução de mel nacional a 50% e 10% e solução de sacarose (açúcar comercial) a 10% como controle.

Para avaliar os corantes foram utilizadas três cores: vermelho (Arcolor, Brasil), azul (Arcolor, Brasil), verde (Arcolor, Brasil), além do tratamento sem corante como controle. Os mosquitos ficaram em contato com o cartão por 24 h (Fig.14) e após este período foram retirados dos potes para avaliar o número de insetos que se alimentaram. A observação dos mosquitos alimentados foi feita primeiramente a olho nu e confirmado com auxílio de lupa. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.



Figura 14. Potes contendo mosquitos em contato com cartão FTA® embebidos em diferentes tipos de soluções de glicose e corantes azul, verde e vermelho.

4.4 Teste de sensibilidade de detecção de RNA viral no cartão FTA

Foi realizado um ensaio de calibração com o objetivo de observar o limite de detecção de RNA do ZIKV no cartão FTA. Para a calibração foi aplicado diretamente no cartão sete concentrações de um estoque de vírus cultivado em células e quantificado via titulação por PFU ($7,2 \times 10^7$ PFU/mL) que resulta na mensuração das partículas virais infectivas através da análise das unidades formadoras de placa de lise (PFU). O vírus utilizado no estudo foi isolado a partir de soro humano em Recife (ZIKV / *H.Sapiens* / Brasil / BRPE243 / 2015) (Faria et al, 2016) pelo Departamento de Virologia e Terapia Experimental do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz Pernambuco e cedidos para a Fiocruz Minas Gerais.

Após a quantificação, foram realizados os cálculos para determinar a diluição seriada que variou de $7,2 \times 10^7$ a $7,2 \times 10^{-2}$. Em cada cartão foi aplicado 10 μ L de solução contendo

$7,2 \times 10^5$ a $7,2 \times 10^4$ unidades formadoras de placa em cada cartão. Os cartões foram colocados para secar pelo período de 14 dias até o momento do processamento. Todas as quantidades foram feitas em triplicatas.

Os cartões foram armazenados a temperatura ambiente por 15 dias e então, foram cortados e colocados em um tubo de micro centrífuga de 1,5 mL. A extração foi realizada utilizando duas metodologias distintas: kit comercial e solução a base de Tris HCl, a fim de estabelecer aquela que fosse melhor para usos posteriores.

Para a primeira metodologia escolhida, foi adicionado 500 μ L de água livre RNase para eluição do material genético viral existente no cartão. Os tubos foram agitados em vórtex por aproximadamente 30 segundos a cada 5 minutos durante um período de 20 minutos. Com o material eluído do cartão, seguiu-se para a extração e purificação de RNA que foi realizada utilizando o kit de extração *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a segunda metodologia, foi adicionado 150 μ L de uma solução contendo Tris 99% (Inlab, Basil), cloreto de sódio (Synth, Brasil) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Synth, Brasil) adicionando 0,6 μ L Proteinase K (Qiagen, Alemanha). As amostras foram agitadas no equipamento LP VortexMixer (ThermoScientific™, USA) e posteriormente colocadas no termociclador (Applied) a 56 °C por 5 minutos, seguido de 98 °C por 15 minutos e resfriado a 12 °C (Dutra 2017).

De posse do material genético das diferentes quantidades de vírus, as amostras foram submetidas à reação de amplificação por RT-qPCR, utilizando iniciadores (ZIKV 835; ZIKV911 a 10 μ M) e sondas específicas para o ZIKV (ZIKV 860-FAM a 10 μ M) (Lanciotti et al. 2008). As sequências dos iniciadores estão descritas na Tabela 1. A reação foi realizada utilizando-se o reagente *GoTaq® probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega, USA) que permite a detecção do RNA em um único passo. As reações foram feitas em equipamento de PCR tempo real *LightCycler® 96* (Roche, Suíça).

Os ciclos de amplificação consistiram nos seguintes passos: 50°C por 15 minutos, para atuação da enzima transcriptase reversa seguidos de 95°C por 2 minutos, para a desnaturação das duplas fitas de DNA e então seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto para amplificação do material genético viral. Como controle positivo foi montada uma curva padrão que foi obtida através de clonagem plasmideal do fragmento de interesse e é utilizada rotineiramente no laboratório Mosquitos Vetores do IRR iniciando na quantidade conhecida de 10^7 ; e seguindo mais 4 pontos com diluição de na base 10 (10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3).

Desta forma foi possível realizar a quantificação de cada concentração pipetada no cartão FTA.

Tabela 1. Primers e sondas utilizados para detecção de ZIKV descritos por Lanciotti 2008

Primer/Sonda	Sequência 5' → 3'
ZIKV 835	TTG GTC ATG ATA CTG CTG ATT GC
ZIKV 911	CCT TCC ACA AAG TCC CTA TTG C
ZIKV 860-FAM	CGG CAT ACA /ZEN/ GCA TCA GGT GCA TAG GAG/3IABkFQ

4.5 Infecção artificial por alimentação oral de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* com ZIKV

Os vírus utilizados (item 4.4) foram amplificados em laboratório seguindo metodologia de Hamel et al (2015). O sobrenadante de cultura de células C6/36 contendo os vírus foram coletados e então ressuspensos em sangue humano para a infecção artificial das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Foram realizadas duas infecções para cada espécie (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações das infecções realizadas com ZIKV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>
Infecção 1	1×10^6 PFU/mL	2×10^7 PFU/mL
Infecção 2	1×10^7 PFU/mL	$4,75 \times 10^6$ PFU/mL

Para a infecção artificial foi utilizada metodologia semelhante à descrita por Dutra e colaboradores (Dutra et al., 2016) que consiste em utilizar alimentadores artificiais que são peças de vidros em formato de funil que foram revestidas por tripa de porco para melhor alimentação dos mosquitos no momento da alimentação. Posteriormente esses alimentadores foram conectados por mangueiras que permitem a circulação de água aquecida à 37°C para manter a solução sanguínea à temperatura semelhante a de mamíferos. Os alimentadores de vidro foram preenchidos pela mistura de sangue e vírus, sendo duas partes de vírus para uma

de sangue (Fig.15) . O sangue utilizado para a infecção foi proveniente de bolsas recebidas através de convênio entre Fiocruz Minas e a Fundação Hemominas. Essas bolsas são doadas por não atenderem o controle de qualidade para a produção de hemoderivados e seriam descartadas. Como controle de qualidade da ausência de arbovírus contaminantes nas bolsas de sangue foram realizados testes moleculares no laboratório do IRR. As fêmeas foram privadas de alimentação por cerca de 24 horas antes da alimentação infectiva e então ficaram por cerca de 1 a 2 horas com o alimentador artificial disponível para alimentação.



Figura 15. Sistema de alimentação artificial utilizado para infecção dos insetos.

Após a o período de alimentação (entre 1 a 2 horas) os mosquitos foram anestesiados com o auxílio de um cilindro de CO₂ e então colocados em placa de vidro em contato com gelo para que mantivessem adormecidos (Fig.16 A). As fêmeas que encontravam se ingurgitadas foram colocadas, com auxílio de pinça, em potes plásticos iguais aos utilizados no item 4.3. Previamente, no fundo de cada pote foi colocado um cartão FTA de 6 cm² para a coleta das excretas (Fig.16 B).



Figura 16. (A) Fêmeas ingurgitadas e anestesiadas após repasto sanguíneo contendo partículas de Zika. (B) Cartão FTA® de 6 cm² colocado ao fundo do pote com rampa para coleta de excretas.

Foram utilizados 15 potes com apenas 1 fêmea, 5 potes com 3 fêmeas e 3 potes com 5 fêmeas a fim de garantir um número mínimo de 15 fêmeas por grupo e por espécie.

Após a exposição ao vírus, todos os mosquitos foram mantidos em condições controladas de temperatura e umidade descritos anteriormente (item 4.2) e alimentados diariamente com solução açucarada a 10%.

No 14^o dia após a alimentação (dpa), os mosquitos foram colocados em contato com o cartão FTA seguindo metodologia citada em 4.3 por 48 horas para a salivação (Fig.17). Após este período os cartões FTA foram coletados individualmente e colocados para secar e mantidos a temperatura ambiente até serem processados para a obtenção do RNA viral.

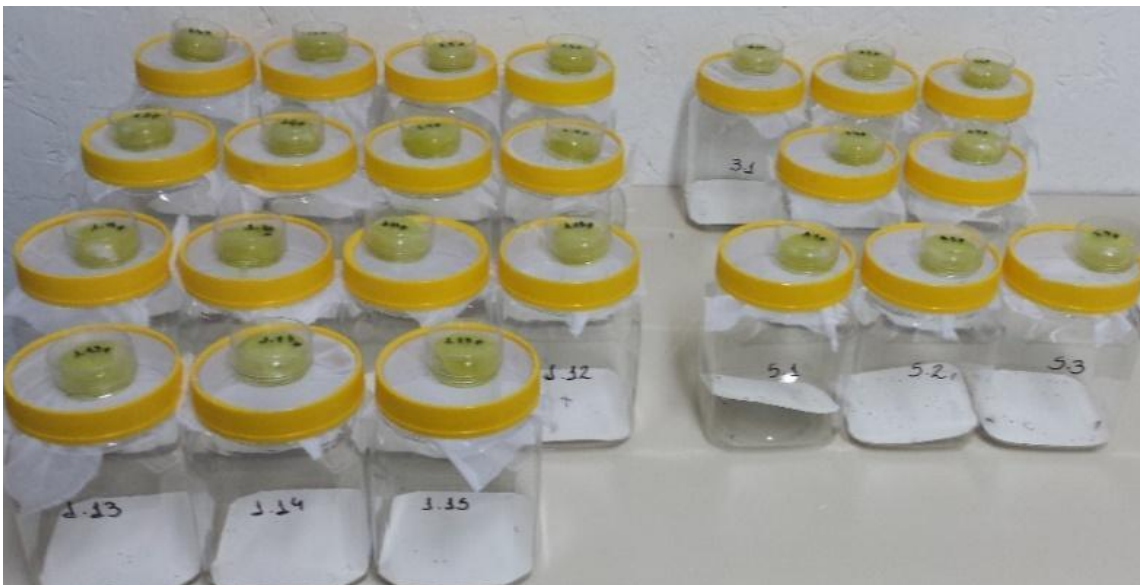


Figura 17. Mosquitos infectados com ZIKV em contato com cartão FTA após 14 dias da alimentação infectiva.

4.6 Avaliação da infecção/disseminação

Ao término do contato com os cartões os mosquitos foram coletados e armazenados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Primeiramente foi realizada a avaliação da taxa de infecção/disseminação nas cabeças e tórax dos mosquitos que foram obtidas a partir da separação do abdômen momentos antes da extração com auxílio de bisturi, para verificar a chegada do vírus as glândulas salivares. pela metodologia de tampão de tris. As cabeças e tórax foram macerados com auxílio de esferas de vidro do tipo beads (Sigma, EUA) em um mascerador (*Minibeadbeater*) (Biospec, EUA) por 30 segundos. Posteriormente foi realizada a extração do material genético de cada mosquito utilizando $50\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução contendo Tris 99% (Inlab, Brasil), cloreto de sódio (Synth, Brasil) e EDTA (Synth, Brasil) e posteriormente adicionando $0,6\text{ }\mu\text{L}$ Proteinase K (Qiagen, Alemanha). As amostras foram colocadas no termociclador (Applied Biosystems, EUA) a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, seguido de $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e resfriado a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dutra et al. 2017). Para as amostras de cabeça e tórax esta metodologia de extração é bastante eficiente devido à quantidade de vírus presente nos mosquitos.

Para a confirmação da de infecção/disseminação viral nas cabeças e tórax foi realizada a RT-qPCR semelhante à descrita no item 4.4, apenas pelo método qualitativo discriminando positivo (presença de RNA viral) e negativo (ausência de RNA viral).

4.7 Processamento dos cartões

Os cartões FTA colocados no topo de cada pote embebidos em solução de mel foram colocados para secar ao fim do contato com os insetos e, então foram armazenados em sacos plásticos à temperatura ambiente por de 15 dias, para posterior processamento. Os papéis colocados para coletar a excreção dos insetos também foram processados da mesma forma que os papéis da saliva.

Os cartões colocados ao fundo que foi utilizado com o objetivo de coletar as excretas, foram eluidos com 4 mL de água livre Rnase (Promega, USA) em tubo Falcon de 15 mL devido ao tamanho dos papéis. A reação foi realizada conforme descrito no item 4.4.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas e a produção dos gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, USA). Os dados de alimentação em soluções açucaradas foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-smirnov e então submetidos aos testes Two Way Anova para verificar se existia diferença entre os tipos de solução testadas.

Os dados de detecção viral no cartão FTA a partir de saliva e excretas foram submetidos a um teste de normalidade D'Agostino-Pearson e posteriormente foi realizado teste não paramétrico Mann-Whitney para verificar se existia diferença entre os grupos de um, três e cinco mosquitos em relação a cópias de RNA viral encontrado.

5. Resultados

5.1 Avaliação da alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* com o cartão FTA

Entre as soluções avaliadas de mel de Manuka, mel nacional ambas nas proporções de 50 e 10% e solução açucarada a 10%, não foi observada diferença estatística entre nenhum parâmetro das diferentes soluções. Contudo, os dados sugerem que a solução de sacarose obteve uma média maior de mosquitos que realizaram a sucção da solução a base de glicose. A solução de mel de origem nacional a 50% foi a solução com maior mortalidade entre os tratamentos. Foi possível observar que poucos insetos não se alimentaram em nenhuma das soluções oferecidas (Fig.18). Também não foi observada diferença significativa (Two Way Anova, $P > 0,05$) entre os grupos com corantes e os grupos sem corante (Fig.19).

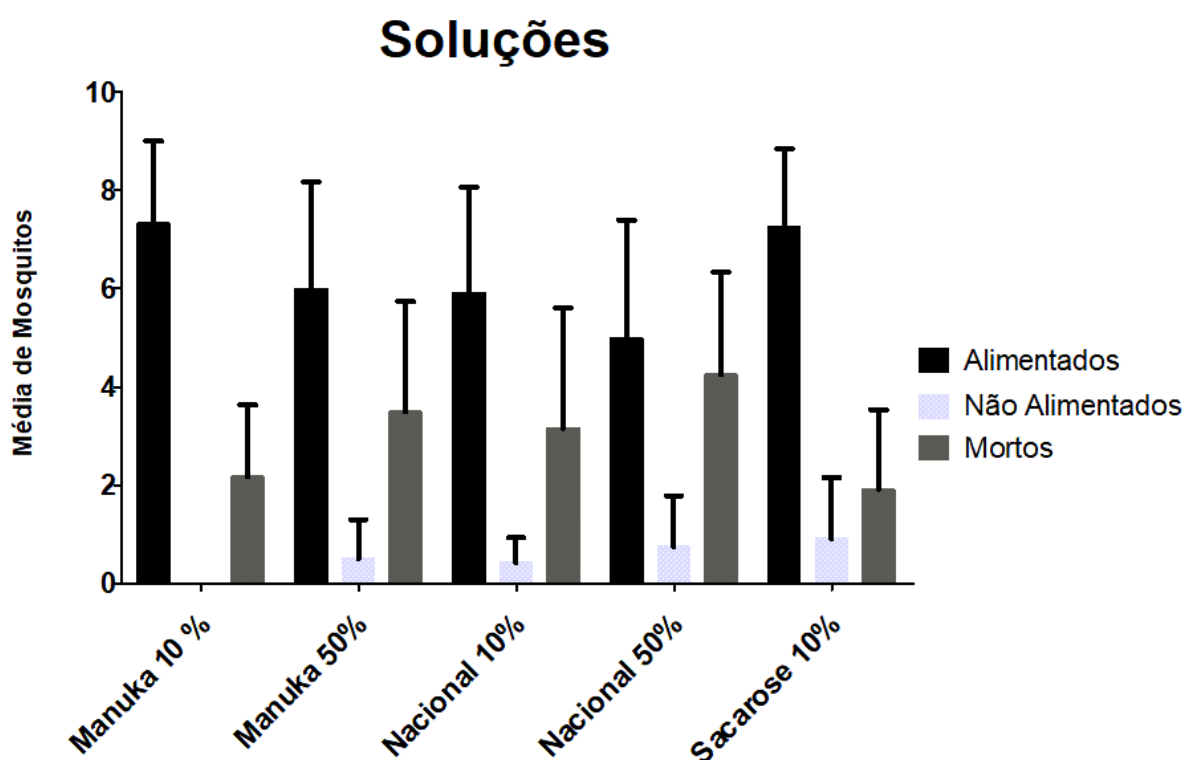


Figura 18. Avaliação da média (desvio padrão) de mosquitos alimentados, não alimentados e mortos por tipo de solução a base de mel de Manuka, mel nacional e sacarose. A avaliação não mostrou diferença estatística entre os tratamentos (Two Way Anova, $P > 0,05$).

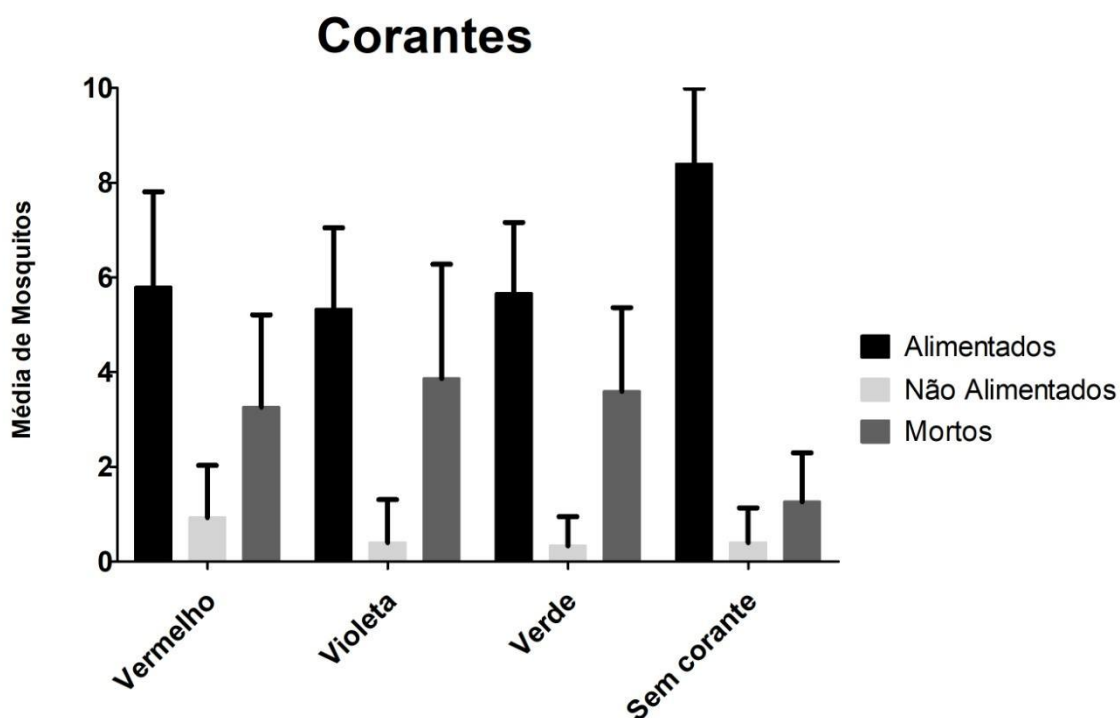


Figura 19. Avaliação da média (desvio padrão) de mosquitos alimentados, não alimentados e mortos por cor de corante. A avaliação não mostrou diferença estatística entre os tratamentos (Two Way Anova, $P > 0,05$).

O número de mosquitos que se alimentaram no tratamento sem corante foi ligeiramente superior às demais, sugerindo uma maior média de insetos alimentados e uma menor média de mortalidade dos insetos. No entanto, como não foi observada diferença estatisticamente significativa (Two Way Anova, $P > 0,05$) entre os tratamentos, optou-se por seguir os experimentos adicionando-se corante verde a solução a base de glicose para permitir a visualização da ingestão ou não da solução pelos insetos (Fig.20) e a eliminação das excretas. Baseado nestes resultados optou-se pela solução de mel de Manuka a 10% como solução a base de glicose que foi utilizada nos experimentos posteriores devido suas propriedades antimicrobianas.



Figura 20. Mosquitos com abdômen ingurgitado com soluções a base de glicose contendo corante de diferentes cores. Da esquerda para a direita primeiro foi o corante azul, segundo o amarelo e terceiro o vermelho.

5.2 Teste de sensibilidade de detecção de RNA viral em Cartão FTA

No teste de sensibilidade de detecção dos cartões, o menor limite de detecção do material genético viral obtido foi de $7,2 \times 10$ cópias de RNA viral. As diluições de $7,2 \times 10^{-1}$ a $7,2 \times 10^{-4}$ não foram detectadas na reação de RT-qPCR quantitativo, apenas os valores de $7,2 \times 10$ a $7,2 \times 10^5$ foram detectados (Fig.21). A medida que a quantidade de partículas virais pipetas foi aumentando a detecção do RNA viral também aumentou. Quando comparada a metodologia de extração por kit comercial e a da solução a base de tris só foi possível amplificar na RT-qPCR as amostras extraídas por kit. A metodologia de extração com a solução contendo Tris 99%, cloreto de sódio, EDTA e proteinase K não permitiu a detecção de material genético viral em nenhuma das diluições.

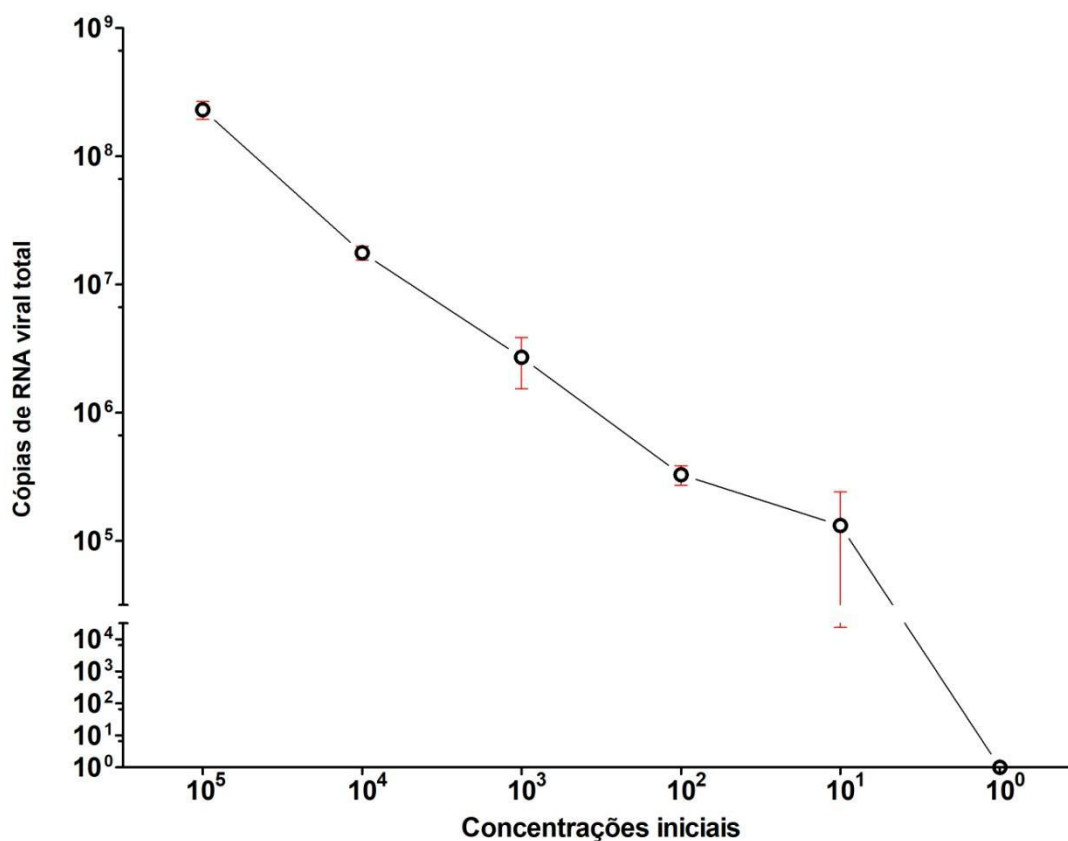


Figura 21. Curva de diluição seriada de concentrações virais aplicadas aos cartões FTA.. Número médio (desvio padrão) de cópias de RNA viral total obtidos mostrando o limite de detecção de material genético viral preservados no cartão FTA em condições de laboratório.

5.3 Avaliação da taxa de infecção

Primeiramente avaliou-se se as cabeças e tórax dos mosquitos que deram origem as salivas apresentavam de infecção por ZIKV. O resultado obtido foi que todas as fêmeas da espécie de *Ae. aegypti* apresentavam RT-qPCR positiva com taxa de infecção observada de 100% nas duas infecções independentes realizadas.

Na primeira infecção de *Ae. albopictus* (cabeças e tórax) foi possível observar que 13 cabeças e tórax de 45 analisadas estavam positivas para o ZIKV, no qual 4 de 15 analisados pertenciam ao grupo de mosquitos individualizados, 3 de 15 analisados do grupo de três mosquitos e 6 de 15 analisados dos grupos de cinco. Sendo assim a taxa de infecção foi de 28,9%. Já na segunda infecção foi possível identificar 30 cabeças e tórax positivas das 45 analisadas e destas 12 de 15 analisados pertenciam ao grupo de mosquitos individualizados,

11 de 15 analisados do grupo de três mosquitos e 7 de 15 analisados dos grupos de cinco (Tabela 3). Nesta segunda infecção a taxa de infecção foi de 66,7%.

Tabela 3. Número de cabeças e tórax positivas e negativas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* obtidos nas duas infecções respectivamente (N=15 em cada grupo).

	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes albopictus</i>			
	Infecção 1 e 2		Infecção 1		Infecção 2	
	Positivo s	Negativo s	Positivo s	Negativo s	Positivo s	Negativo s
Grupos de 1	15	0	4	11	12	3
Grupos de 3	15	0	3	12	11	4
Grupos de 5	15	0	6	9	7	8

5.4 Avaliação da detecção de ZIKV proveniente da salivação de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no cartão FTA

Através das análises dos cartões FTA oriundos da salivação dos mosquitos foi possível identificar cartões positivos para RNA viral de ZIKV em todos os grupos de fêmeas de *Ae. aegypti*. Os resultados obtidos foram apresentados na figura 22. Na primeira infecção foram identificados dois cartões de saliva positivos nos grupos de uma fêmea com média de 79,864 cópias de RNA viral, três cartões foram positivos nos grupos de 3 fêmeas com média de 912,096 cópias e dois foram positivos nos grupos de 5 fêmeas com média de 15341,13 cópias. Na segunda infecção foram identificados 11 cartões positivos nos grupos de uma fêmea com média de 6193,455 cópias, não foi identificado nenhum cartão positivo nos grupos de 3 fêmeas e foram identificados dois positivos nos grupos de 5 fêmeas com média de 219,7013 cópias. Na primeira infecção foi observada diferença estatística entre os grupos com 1 e 3 mosquitos ($P = 0,0390$), e entre o um e cinco ($P = 0,028$). Na segunda infecção os grupos 1 e 3 mosquitos apresentaram diferença estatística ($P = 0,0242$).

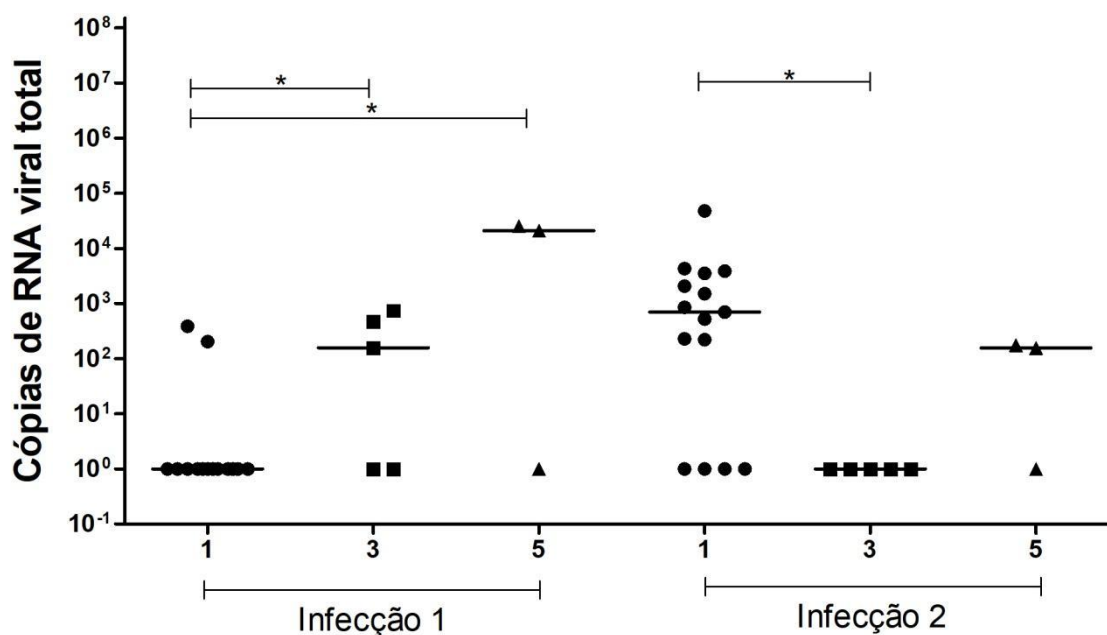


Figura 22. Gráfico de dispersão das concentrações de RNA de ZIKV obtidos nas amostras de cartões FTA contendo saliva de *Ae. aegypti* na primeira e na segunda infecção para os 3 grupos testados. Teste não paramétrico Mann-Whitney (* = $P < 0,05$)

As avaliações da presença de ZIKV oriundos dos cartões que tiveram contato com os mosquitos da espécie *Ae. albopictus* também foi possível identificar cartões positivos para material genético viral em todos os grupos e foram plotados na figura 23. Na primeira infecção foram identificados nove cartões positivos, sendo sete positivos nos grupos de 1 inseto com média de 2133800 cópias de RNA viral e dois no grupo de 3 insetos com média de 2115,584 cópias. Não foi possível detectar nenhuma amostra positiva nos grupos de 5 fêmeas. Na segunda infecção foram detectados cinco cartões positivos no grupo de 1 inseto com média de 158678 cópias, no grupo de 3 insetos foram identificados dois cartões positivos com média de 6666 cópias e no grupo de 5 mosquitos apenas um apresentando 3733,333 cópias de RNA viral. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados (Mann-Whitney $P > 0,05$).

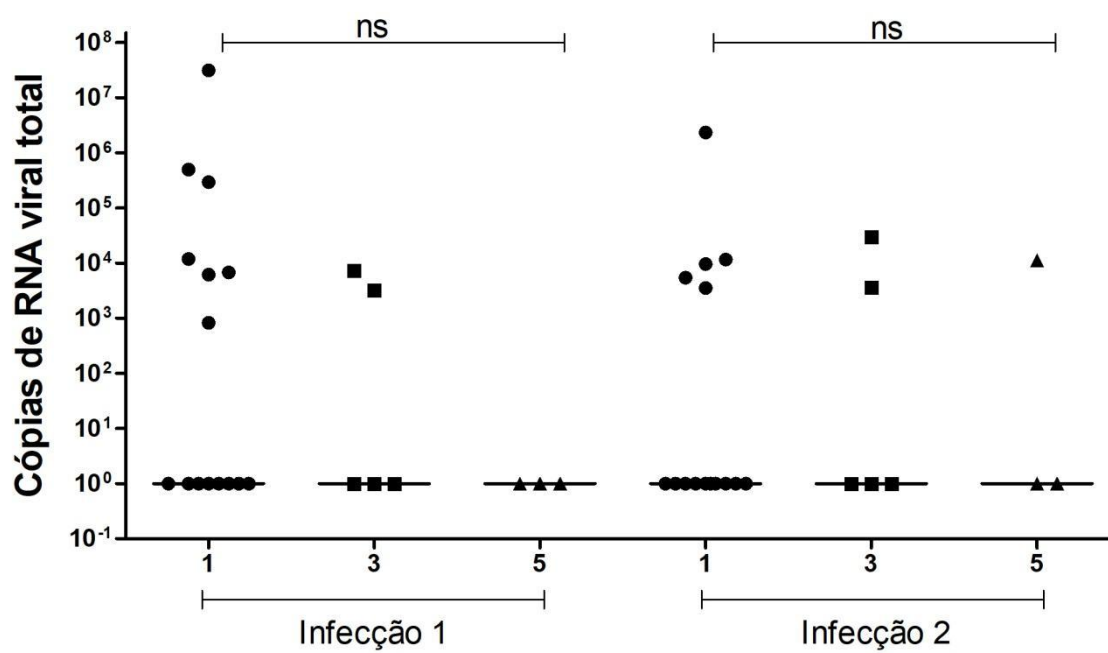


Figura 23. Gráfico de dispersão mostrando as concentrações de RNA de ZIKV das amostras de cartões FTA contendo saliva de *Ae. albopictus*, na primeira e segunda infecções. ns = não significativo Mann-Whitney.

5.5 Avaliação da presença de ZIKV nos cartões FTA contendo excreta de mosquitos

Nos cartões colocados no fundo dos potes plásticos das fêmeas de *Ae. aegypti* foi possível distinguir as excretas oriundas da digestão do sangue das excretas oriundas da alimentação de sacarose contendo corante verde. Na figura 24 pode-se observar pontos mais escuros que foram originários da digestão sanguínea e pontos mais claros com tonalidade amarelo-esverdeado originários da excreção da solução de glicose contendo corante verde. Em todos os cartões colocados no fundo dos potes com *Ae. aegypti* foi possível detectar RNA viral. No primeiro experimento foi observada uma quantificação homogênea entre os grupos avaliados, não havendo diferença estatística (Mann-Whitney $P > 0,05$) entre os tratamentos realizados (Fig.25). Já no segundo experimento foi possível observar que a quantidade de cópias virais obtidas no grupo que continha um mosquito por pote foi menor que no grupo que continha três. E que no grupo que continha cinco mosquitos a quantidade de cópias de RNA viral foi maior que no grupo que continha três. Não foi observada diferença estatística entre os grupos do primeiro experimento. No segundo experimento houve uma diferença estatística entre o grupo um e cinco com Mann-Whitney $P = 0,0244$.

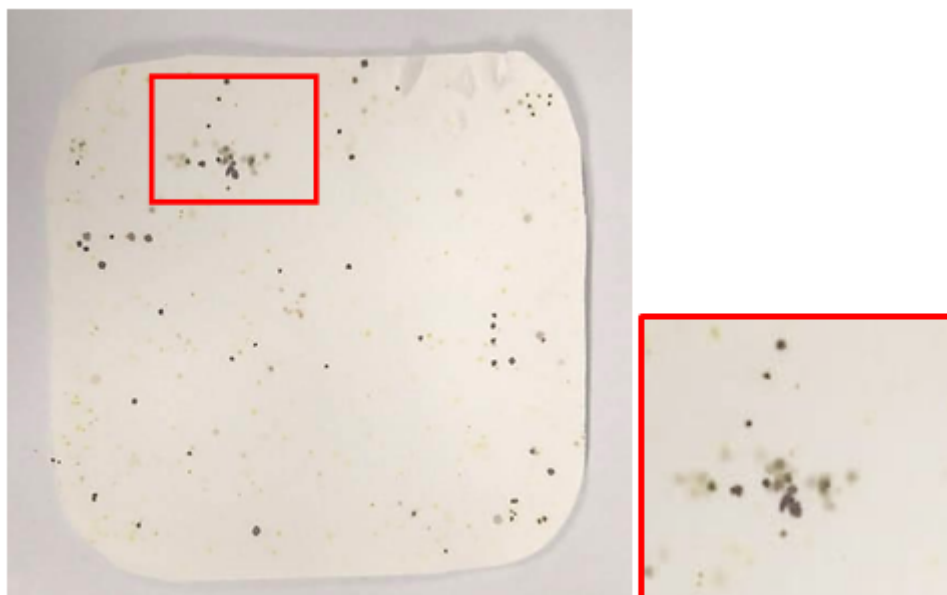


Figura 24. Observação da coloração das excretas dos mosquitos nos cartões FTA colocado no fundo dos potes plásticos. O detalhe mostra a presença de sangue digerido (pontos mais escuros) e excretas coloridas pelo corante verde presente na solução de mel a qual o cartão FTA estava embebido para a salivação.

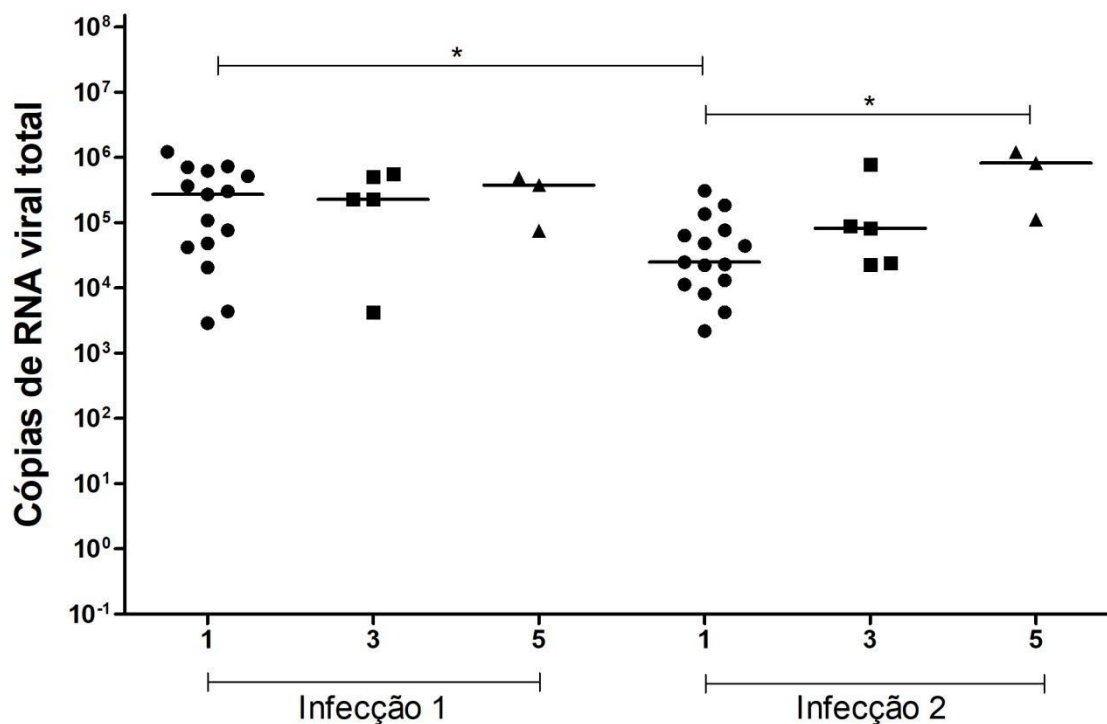


Figura 25. Gráfico de dispersão mostrando as concentrações de material genético de ZIKV nas amostras de cartões FTA contendo excretas de *Ae. aegypti*. Na primeira e segunda infecções. Mann-Whitney * = $p < 0,05$

Os cartões colocados no fundo dos potes plásticos para análise das excretas foram positivos tanto para *Ae. aegypti* quanto *Ae. albopictus*, com a exceção de um cartão do grupo de um inseto da segunda infecção dos *Ae. albopictus*. Esses dados obtidos na análise das excretas para *Ae. albopictus* foram apresentados na figura 26. Na primeira infecção de *Ae. albopictus* foi observada diferença estatística entre os grupos um e três mosquitos (Mann-Whitney $P = 0,0362$), na segunda infecção os grupos um e três também apresentaram diferença estatística (Mann-Whitney $P = 0,0232$).

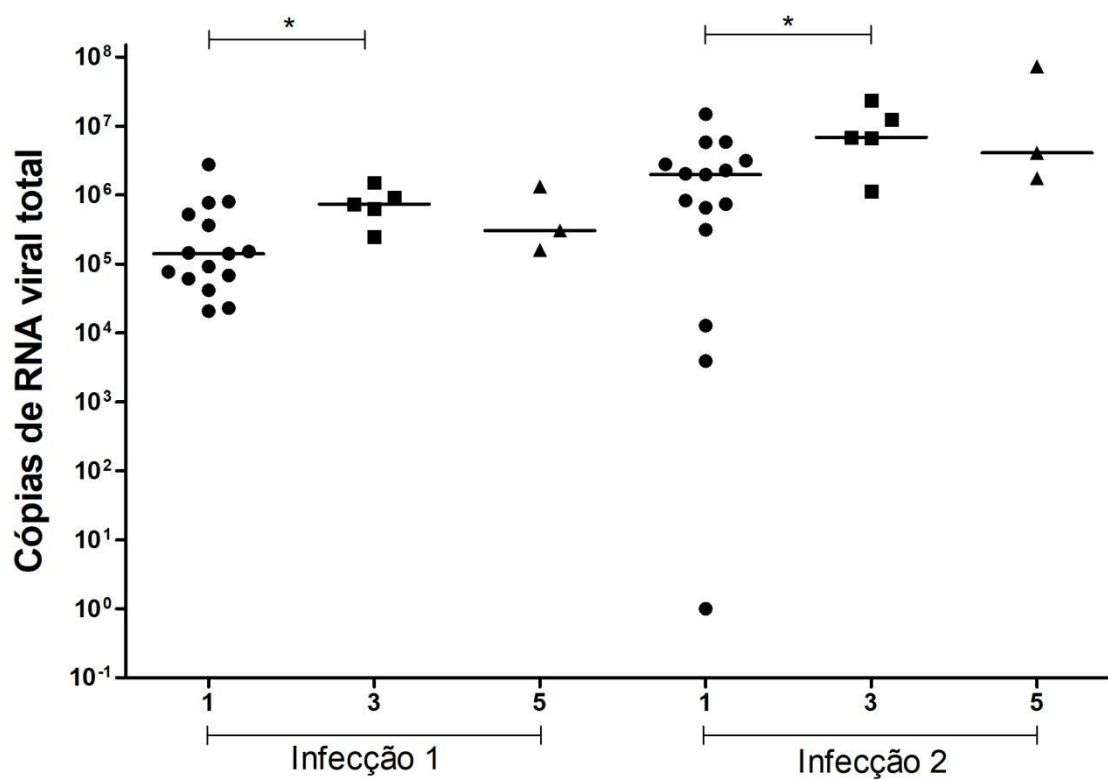


Figura 26. Gráfico de dispersão mostrando as concentrações de material genético de ZIKV nas amostras de cartões FTA contendo excretas de *Ae. albopictus* na primeira e segunda infecções. Mann-Whitney * = $p < 0,05$

6. Discussão

Atualmente o monitoramento da circulação de arbovírus em populações de mosquitos vem sendo frequentemente utilizado com o objetivo de possibilitar a prevenção de possíveis surtos de arboviroses nos locais onde esses vírus estão circulando (Van den Hurk et al. 2012). Das metodologias existentes, uma que tem sido explorada é o uso de animais sentinelas. Essa metodologia vem sendo utilizada desde os anos 1960 por permitir a identificação das localidades com circulação viral (Turell e Kay 1998).

O uso de animais sentinelas baseia-se na identificação de arbovírus através de exames sorológicos realizados nos animais estrategicamente posicionados. O maior desafio desta metodologia é o diagnóstico diferencial entre as arboviroses, pois há reações cruzadas entre eles, principalmente aqueles que pertencem a mesma família como é o caso de DENV e ZIKV. As reações cruzada tem tornado os resultados inespecíficos e outro entrave da metodologia é a implicação ética associada ao uso de animais. Portanto, novas metodologias bem como o aprimoramento daquelas que já vem sendo utilizadas são necessárias para sanar estes problemas (Ritchie et. al 2003).

Uma nova alternativa vem sendo desenvolvida para substituir a utilização de animais sentinelas permitindo realizar o monitoramento da circulação viral de forma mais eficiente. A utilização de uma nova técnica baseada na salivação de partículas virais em cartões FTA vem sendo descrita e vem apresentando resultados bastante promissores (Flies et al. 2015; S. Hall-Mendelin et al. 2010; Johnson et al. 2015).

Com o intuito de possibilitar o monitoramento viral de forma mais eficiente, o presente trabalho, realizou um estudo de padronização da detecção de ZIKV em mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. Albopictus*, usando cartões FTA. Primeiramente realizou-se a avaliação da alimentação de fêmeas de mosquitos de *Ae. aegypti* em cartões FTA embebidos em diferentes soluções e concentrações de mel para detectar o melhor tipo e concentração da solução a ser utilizada nos cartões. O estudo foi pioneiro em comparar diferentes tipos de soluções e corantes para a alimentação dos mosquitos nos cartões. Os resultados demonstraram que seria possível utilizar esta metodologia para a coleta de saliva dos mosquitos, uma vez que os insetos alimentaram de forma satisfatória nos cartões FTA embebidos em diferentes soluções de mel.

Adicionalmente foi observado que a utilização de corantes nas soluções de mel teve grande importância para permitir visualizar a alimentação dos insetos. Os resultados desse

estudo corroboram com os resultados encontrados por pesquisadores da Austrália e Estados Unidos (Flies et al. 2015; Hall-Mendelin et al. 2010; Johnson et al. 2015), que também utilizaram soluções de mel de manuka com corante para a obtenção da saliva de mosquitos através do cartão FTA. Portanto, a coleta de saliva através do cartão FTA embebido em solução de mel é uma metodologia importante para possibilitar a detecção de RNA viral em mosquitos vetores de ZIKV. Acredita-se que a utilização de soluções de mel nos cartões FTA juntamente com os corantes não interfere na composição e capacidade de armazenamento do material genético viral dos cartões, uma vez que foi possível realizar a detecção de RNA viral por RT-qPCR após período de armazenamento dos cartões.

Foi realizado o teste de sensibilidade para verificar a quantidade mínima detectável de ZIKV a partir dos cartões FTA. Neste teste de sensibilidade foram avaliadas duas técnicas de extração do RNA viral preservado nos cartões. No estudo foi observado que o método de extração mais eficiente para cartões FTA contendo material genético viral foi o kit comercial. Também foi possível observar que a metodologia que utiliza uma solução a base de tris não foi eficiente para extrair o RNA do cartão FTA pela forma que foi realizada. No entanto, estudo realizado por um grupo de pesquisadores da Fiocruz em Belo Horizonte, Minas Gerais, mostrou a possibilidade de extrair o RNA viral de mosquitos inteiros diretamente colocados na solução a base de tris (Dutra et al. 2017). Essa diferença pode ter ocorrido devido as quantidades de material genético viral presentes nas amostras, uma vez que em mosquitos inteiros a carga viral é maior que apenas na saliva. Os resultados sugerem que a extração pelo kit comercial foi mais sensível que a extração através da solução a base de tris.

O estudo possibilitou verificar que o cartão FTA possui uma boa capacidade de armazenamento do RNA, pois permitiu a detecção do material genético preservado por 15 dias. O presente estudo é pioneiro em avaliar a sensibilidade de detecção do ZIKV preservado em cartão FTA em saliva de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. A menor quantidade de ZIKV detectada nos cartões FTA foi do ponto de $7,2 \times 10^4$ PFU onde o resultado via RT-qPCR foi em média de 132.189,9 cópias de RNA viral, cujo valor foi satisfatório uma vez que o estudo de Lanciotti e colaboradores (Lanciotti et al. 2008) mostrou que o primer utilizado apresentava sensibilidade de 100 partículas.

O presente trabalho demonstrou que a infecção com ZIKV por alimentação oral dos insetos através de um sistema artificial foi eficiente e atingiu 100% dos mosquitos da espécie *Ae. aegypti*. O sucesso desta infecção reforça sua atuação como principal espécie vetora, uma vez que demonstrou grande suscetibilidade ao ZIKV corroborando com estudos que avaliaram a capacidade de transmissão do inseto (Chouin-Carneiro et al. 2016; Li et al. 2012).

Para os mosquitos da espécie *Ae. albopictus*, a taxa de infecção mostrou-se eficiente, porém com uma infecção mais baixa com 28,9% no primeiro experimento, enquanto que no segundo a taxa de infecção foi de 66,7%. Portanto, *Ae. albopictus* demonstrou menor susceptibilidade ao ZIKV quando comparado ao *Ae. aegypti*.

A competência vetorial do *Ae. albopictus* para ZIKV já foi relatada em diversos estudos (Chouin-Carneiro et al. 2016; Grard et al. 2014; Liu et al. 2017; Wong et al. 2013), Além disso já foi demonstrado que o *Ae. albopictus* possui a capacidade de transmitir mais de vinte tipo de arbovírus (Paupy et al. 2009).

Existem vários países asiáticos que há pouco ou nenhum relato da presença de *Ae. aegypti*, desta forma a espécie *Ae. albopictus* é incriminada como principal vetora de arboviroses (Gratz 2004). Portanto, o presente trabalho sugere que a capacidade de infecção observada no *Ae. albopictus* foi menor que no *Ae. aegypti* e que essa menor taxa de infecção na espécie *Ae. albopictus* confirma sua importância como vetor secundário nas transmissões de ZIKV no Brasil. Além do mais, sabe-se que o *Ae. albopictus* está melhor estabelecido em regiões subtropicais e nestas regiões esta espécie poderia ter um papel mais relevante na transmissão de ZIKV.

A utilização de uma nova metodologia para detecção de RNA viral em mosquitos deu-se a partir da observação de que RNA viral que podem ser eliminadas durante a alimentação em soluções açucaradas (Doggett et al. 2001; Van den Hurk et al. 2007). Portanto, o presente estudo avaliou a possibilidade da utilização da saliva expelida em cartões FTA como método de detecção viral.

No presente estudo foi possível identificar material genético viral em todos os grupos testado, sendo os grupos de 1 fêmea, 3 fêmeas e 5 fêmeas, mostrando a possibilidade de identificar material genético viral em saliva de apenas um mosquito. Um estudo realizado por Lothrop et al.(2012) foi demonstrada a detecção de WNV em saliva de vetores com a utilização de papéis filtro, no entanto a metodologia utilizando esse material não possui capacidade de armazenamento e preservação do material genético viral, necessitando de coletas e análises imediatas das amostras. O processamento e análise das amostras logo após a coleta necessitam de infraestrutura adequada no local da coleta e em situação de campo, na maioria das vezes, isso não é possível. Em um estudo realizado por grupo de pesquisa da Austrália, o cartão FTA foi utilizado para solucionar este problema do tempo de preservação do material genético viral, uma vez que inserção do cartão dentro de armadilhas possibilitou maior permanência das armadilhas em campo (Hall-Mendelin et al.2010) .

No presente estudo aplicou-se essa metodologia para identificar o RNA viral de ZIKV, o qual se mostrou eficiente para a detecção de material genético de ZIKV presente na saliva de mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Além do mais, foi possível identificar RNA viral nos cartões FTA com a saliva de apenas um mosquito. No estudo de Guedes et al. (2017), também se observou a eficiência da metodologia para detecção de RNA de ZIKV a partir de saliva expectorada por mosquitos.

Outros estudos mostraram a eficiência da técnica com outros vírus tais como RRV, WNV, CHIKV entre outros (Flies et al. 2015; Hall-Mendelin et al. 2010; Melanson et al. 2017; Nguyen et al. 2015). A metodologia do uso de cartões FTA mostrou-se uma forma prática e eficiente de identificar a presença de RNA viral nas salivas dos insetos possibilitando o monitoramento viral em várias regiões. Sendo assim, o cartão FTA destaca-se entre as outras metodologias de monitoramento viral, como a identificação viral diretamente nos vetores a partir de análises moleculares, além do isolamento viral.

No presente estudo, algumas cabeças não apresentaram positividade de material genético viral de ZIKV, no entanto os cartões FTA que ficaram em contato com esses mosquitos, apresentaram positividade na análise da saliva. Acredita-se que o ocorrido se deve a baixa infecção do inseto e a metodologia utilizada para a extração do RNA viral a partir das cabeças dos insetos. A extração utilizada para as cabeças (onde estão localizadas as glândulas salivares), foi a de solução a base de tris onde não permite a purificação do RNA viral como acontece quando a amostra é extraída com kit comercial, tornando assim indetectável na reação de RT-qPCR. No entanto, não foi avaliada as concentrações de infecção de cada inseto, tornando necessários estudos complementares para comprovar a hipótese.

Já foi demonstrada a utilização da metodologia de cartões FTA associada a armadilhas para capturas de adultos como BG-sentinela e também modificações de ovitrampa (Flies et al. 2015; Girod et al. 2016; Hall-Mendelin et al. 2010; Johnson et al. 2015). As armadilhas para adultos são uma boa fonte de informação sobre a população de mosquitos existentes (Melo et al. 2012), e quando utilizada em conjunto com os cartões FTA podem também indicar a circulação viral

No presente trabalho, a avaliação dos cartões FTA presentes no fundo dos potes para a coleta de excretas também demonstraram resultados promissores para uma nova forma de detecção viral, sendo melhores que os resultados obtidos por saliva, corroborando com estudo de (Fontaine et al. 2016; Ramírez et al. 2018). Nos estudos mostraram que o uso de excretas para detecção viral em mosquitos foi possível para DENV, RRV e WNV, permitindo concluir que as excretas eram uma maneira fácil e eficiente de detectar vírus, sendo mais sensível que

a saliva. Nos estudos realizados em laboratório, os mosquitos foram colocados em potes após a alimentação infectiva para possibilitar a coleta dos materiais que foi realizada diariamente. A metodologia de coleta diária das excretas, sem a utilização do cartão FTA utilizadas por eles, impede o uso da metodologia em possíveis armadilhas de monitoramento, uma vez que essas armadilhas não possuem vistorias diárias. Com a utilização do cartão FTA, seria possível a aplicação da metodologia do uso de excretas para análise viral, uma vez que o material não correria risco de degradar, não necessitando de vistorias diárias.

No presente estudo, assim como nos realizados por Fontain et al. (2016) e Ramírez e al. (2018), também demonstrou que foi possível detectar a presença de material genético de viral nas excretas dos insetos. Entretanto, no presente trabalho a coleta foi realizada com a utilização dos cartões FTA presentes ao fundo dos potes. Os cartões foram analisados ao término dos experimentos e possibilitaram a detecção de partículas virais após 15 dias. Foi possível identificar excretas positivas para RNA viral em praticamente todos os cartões com exceção de apenas um.

Contudo, não houve detecção positiva de ZIKV em todos os insetos que ficaram em contato com o cartão. Acredita-se que a positividade desses cartões se deu a partir de partículas virais presentes no sangue digerido pelos insetos, e não provenientes de uma infecção sistêmica no inseto, assim como citado em outro estudo que avaliou a presença de RNA viral em excretas (Ramírez et al. 2018).. Portanto, para determinar se a detecção de ZIKV presentes na excreção é proveniente de uma infecção sistêmica no inseto e não fruto da digestão sanguínea necessita de futuros estudos em diferentes tempos da digestão sanguínea e após a digestão sanguínea, sendo que a digestão sanguínea tem um início rápido geralmente com 12 horas e pode se estender até 72 horas após a ingestão de sangue já se observa excretas provenientes da digestão sanguínea (Consoli & Oliveira 1994).

7. Conclusões

O estudo da avaliação do cartão FTA para detecção de ZIKV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* permitiu concluir que :

- A alimentação de mosquitos em cartões FTA embebidos em soluções de mel mostrou-se uma boa forma de coleta e preservação de saliva nos cartões.
- A extração de RNA a partir de cartões FTA que se apresentou mais eficiente foi a utilização de Kit comercial.
- O cartão FTA possibilitou o armazenamento e detecção de pequenas concentrações de material genético de ZIKV.
- O *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* possuem grande suscetibilidade ao ZIKV, sendo assim bons vetores do ZIKV.
- A metodologia do uso de cartões FTA para detecção de ZIKV a partir da saliva de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* mostrou-se uma boa alternativa para monitoramento viral podendo ser aplicado para outras arboviroses.
- As excretas oferecem uma boa detecção viral mostrando-se mais sensível que a saliva para esse tipo de estudo.

8. Considerações finais

A grande preocupação com arboviroses vem crescendo a cada dia e com isso o desenvolvimento de novas metodologias para detecção e monitoramento de ZIKV e outras arboviroses em populações de mosquitos torna-se cada vez mais necessária. As espécies de mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* possuem grande susceptibilidade ao ZIKV tornando-se as principais vetoras para o vírus. Sendo assim, a aplicação de medidas de controle baseadas no monitoramento viral a partir desses insetos torna-se extremamente importantes e relevantes.

Muitos estudos já foram realizados com o objetivo de permitir o monitoramento viral a partir dos vetores. Os estudos baseados na expectoração de vírus através da saliva foi o grande salto para o desenvolvimento de novas metodologias para detecção de arboviroses utilizando a saliva dos insetos. Nesse estudo foi possível observar que a metodologia do cartão FTA é uma alternativa para esse propósito podendo auxiliar as metodologias já existentes no combate ao ZIKV.

Outra metodologia que mostrou boa aplicabilidade para detecção viral em mosquitos vetores foi a utilização de excretas dos mosquitos. O uso das excretas para esta finalidade se mostrou um método sensível que permite o monitoramento viral. Até o momento não foram realizados estudos em campo com a utilização de excretas para tal monitoramento viral. Os estudos já realizados com a metodologia ainda estão em fase inicial em condições laboratoriais. Além disso, não havia sido realizado estudos com a utilização do cartão FTA como método de coleta e preservação do material. O presente estudo foi inédito na avaliação do método baseado na coleta e armazenamento de excretas com o cartão FTA. Os resultados demonstraram que o método permite a detecção viral nas excretas após quinze dias de coleta do material com o cartão FTA, o que possibilitaria o uso da metodologia em campo. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a aplicabilidade em campo.

A utilização do cartão FTA mostrou-se altamente sensível para a preservação do material genético viral podendo ser utilizado em associação às armadilhas. Sendo assim, será possível realizar o monitoramento da população de mosquitos e circulação viral com maior facilidade, mesmo em áreas remotas com pouca estrutura e de difícil acesso. Mais estudos são necessários para validar a aplicabilidade da metodologia associadas às armadilhas. O monitoramento da circulação viral permite o combate prévio de possíveis surtos das doenças transmitidas por mosquitos, uma vez que possibilita o conhecimento prévio das populações de vetores infectados por ZIKV podendo-se aplicar medidas prévias para o controle do vetor.

Poucos estudos estão sendo realizados com a metodologia do cartão FTA, trazendo a necessidade de expansão desse conhecimento. A metodologia mostra-se promissora e poderá ser aplicada em associação a metodologias de monitoramento vetorial já existentes, além de permitir o uso em diversas arboviroses e outras doenças também transmitidas por mosquitos como protozoários e helmintos.

9. Referências Bibliográficas

ALANIZ, A. J. Zika Virus: A Compendium of the State of Knowledge. In: **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 1–11.

ALPHEY, L. et al. Sterile-Insect Methods for Control of Mosquito-Borne Diseases: An Analysis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 295–311, abr. 2010.

AMRAOUI, F. et al. Culex mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 21, n. 35, 1 set. 2016.

ARAUJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. Síndrome de Guillain-Barré associada ao surto de infecção por vírus Zika no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253–255, mar. 2016.

AYE, K. S. et al. FTA Card Utility for PCR Detection of Mycobacterium leprae. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 64, p. 246–248, 2011.

BARGIELOWSKI, I. et al. Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of aedes aegypti. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20699, 17 jun. 2011.

BARONTI, C. et al. Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013. **Genome announcements**, v. 2, n. 3, p. e00500-14, 5 jun. 2014.

BATISTA, M. et al. Natural Products Isolated from Oriental Medicinal Herbs Inactivate Zika Virus. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 49, 2019.

BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: An argument for the sterile insect technique. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 8, p. 349–355, 2003.

BENELLI, G.; ROMANO, D. Mosquito vectors of Zika virus. **Entomologia Generalis**, v. 36, n. 4, p. 309–318, 2017.

BERTHET, N. et al. Molecular Characterization of Three Zika Flaviviruses Obtained from

Sylvatic Mosquitoes in the Central African Republic. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 12, p. 862–865, 16 dez. 2014.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 3 abr. 2014.

BIAN, G. et al. The Endosymbiotic Bacterium Wolbachia Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000833, 1 abr. 2010.

BLACK, W. C. et al. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 379–388, 1 jul. 2002.

BOND, J. G. et al. Optimization of irradiation dose to *Aedes aegypti* and *Ae . albopictus* in a sterile insect technique program. 2019.

BRAKS, M. A. H. et al. Convergent Habitat Segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil and Florida. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 785–794, 1 nov. 2003.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, out. 2015.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 9 abr. 2016.

CARLETTI, F. et al. Rapid detection and quantification of Chikungunya virus by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction real-time assay. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 3, p. 521–4, set. 2007.

CARNEIRO, T. C.; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ. RIO DE JANEIRO, R. B. Interação vírus-vetorcaracterização da região 3\2019 não-codificante (NC) de vírus dengue tipo 3 (DENV-3), isolados de mosquitos e humanos, após a infecção experimental sucessiva e simultânea em mosquitos. 2014.

CARVALHO, D. O. et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003864, 2 jul. 2015.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 21 maio 2016.

CHIEN, L. J. et al. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1295–1304, 2006.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004543, 3 mar. 2016.

CHUNG, H. N. et al. Toward Implementation of Mosquito Sterile Insect Technique: The Effect of Storage Conditions on Survival of Male *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) during Transport. **Journal of Insect Science**, v. 18, n. 6, p. 1–7, 2018.

DA CUNHA SANTOS, G. **FTA cards for preservation of nucleic acids for molecular assays a review on the use of cytologic/tissue samples**. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. **Anais...the College of American Pathologists**, 1 mar. 2018Disponível em: <<http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2017-0303-RA>>. Acesso em: 5 jan. 2019

DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, 2016.

DE ABREU, F. V. S. et al. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 669–676, 2015.

DE ARAÚJO, T. V. B. et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1356–1363, 1 dez. 2016.

DE FIGUEIREDO, R. M. P. et al. Identification of dengue viruses in naturally infected *Aedes aegypti* females captured with BioGents (BG)-sentinel traps in Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 221–222, 2013.

DE MELO, D. P. O.; SCHERRER, L. R.; EIRAS, Á. E. Dengue Fever Occurrence and Vector Detection by Larval Survey, Ovitrap and MosquiTRAP: A Space-Time Clusters Analysis.

PLoS ONE, v. 7, n. 7, p. e42125, 25 jul. 2012.

DELATTE, H. et al. Geographic Distribution and Developmental Sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) During a Chikungunya Epidemic Event. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25–34, fev. 2008.

DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109442, 13 out. 2014.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1 set. 1952.

DOGGETT, S.; KLOWDEN, M.; RUSSELL, R. Are vector competence experiments competent vector experiments? **Arbovirus Research in Australia**, v. 8, p. 126–130, 2001.

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

DUGGAL, N. K. et al. Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. **Cell Reports**, v. 18, n. 7, p. 1751–1760, 2017.

DUTRA, H. L. C. et al. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of Wolbachia in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003689, 23 abr. 2015.

DUTRA, H. L. C. et al. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016.

DUTRA, H. L. C. et al. Development and physiological effects of an artificial diet for Wolbachia-infected *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

EIRAS, A. E. et al. A high-risk Zika and dengue transmission hub: Virus detections in mosquitoes at a Brazilian university campus. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 359, 22 jun. 2018.

EIRAS, A. E.; BUHAGIAR, T. S.; RITCHIE, S. A. Development of the Gravid *Aedes*

Trap for the Capture of Adult Female Container-Exploiting Mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 200–209, jan. 2014.

EIRAS, Á. E.; RESENDE, M. C. Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. suppl 1, p. S45–S58, 2009.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: Virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **Journal of Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 213–219, out. 1979.

FARAJOLLAHI, A. et al. Field Efficacy of BG-Sentinel and Industry-Standard Traps for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and West Nile Virus Surveillance. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 4, p. 919–925, 1 jul. 2009.

FAY, R. W. ; G. JR. ; G. B. Genetically marked *Aedes aegypti* in studies of field populations. **Mosquito News**, v. 29, n. 1, 1969.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 311, 22 out. 2013.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 9 jan. 2014.

FERNANDES, R. S. et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004993, 6 set. 2016.

FERREIRA, C. P.; YANG, H. M.; ESTEVA, L. ASSESSING THE SUITABILITY OF STERILE INSECT TECHNIQUE APPLIED TO *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Systems**, v. 16, n. 04, p. 565–577, 21 dez. 2008.

FILIFE, A. R.; MARTINS, C. M. V; ROCHA, H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 43, n. 4, p. 315–319, 1973.

FLIES, E. J. et al. Converting Mosquito Surveillance to Arbovirus Surveillance with Honey-Baited Nucleic Acid Preservation Cards. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 7, p. 397–403, 17 jul. 2015.

FONTAINE, A. et al. Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24885, 27 jul. 2016.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Volume 2 ed. São Paulo: [s.n.].

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, maio 2011.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, p. 30252, 9 jun. 2016.

FU, G. et al. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 353–357, 18 mar. 2007.

FU, G. et al. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4550–4, 9 mar. 2010.

FUJITA, Y.; KUBO, S. I. Application of FTA® technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. **Legal Medicine**, v. 8, n. 1, p. 43–47, 1 jan. 2006.

GAO, Q. et al. [Infestation status *Aedes albopictus* and related mosquito-borne infectious disease risk in central urban area in Shanghai]. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 37, n. 5, p. 600–5, maio 2016.

GIRARD, Y. A.; KLINGLER, K. A.; HIGGS, S. West Nile Virus Dissemination and Tissue Tropisms in Orally Infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 4, n. 2, p. 109–122, 9 jun. 2004.

GIROD, R. et al. Detection of Chikungunya Virus Circulation Using Sugar-Baited Traps during a Major Outbreak in French Guiana. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004876, 8 set. 2016.

GRARD, G. et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2681, 6 fev. 2014.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and**

Veterinary Entomology, v. 18, n. 3, p. 215–227, set. 2004.

GROVER, K. K. et al. FIELD EXPERIMENTS ON THE COMPETITIVENESS OF MALES CARRYING GENETIC CONTROL SYSTEMS FOR Aedes Aegypti. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 20, n. 1, p. 8–18, 1 mar. 1976.

GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 8, p. e69, 9 ago. 2017.

GUO, X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 9, p. e102–e102, 7 set. 2016.

GURUKUMAR, K. et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. **Virology Journal**, v. 6, p. 1–8, 2009.

GUSTAVSSON, I. et al. Use of FTA card for dry collection, transportation and storage of cervical cell specimen to detect high-risk HPV. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. 2, p. 112–116, 1 out. 2009.

HADDOW, A. J. et al. TWELVE ISOLATIONS OF ZIKA VIRUS FROM Aedes (Stegomyia) africanus (Theobald) taken in and above a Uganda forest. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, n. 1, p. 57–69, 1964.

HALL-MENDELIN, S. et al. Exploiting mosquito sugar feeding to detect mosquito-borne pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11255–11259, 2010.

HALL-MENDELIN, S. et al. FTA cards facilitate storage, shipment, and detection of arboviruses in infected *Aedes aegypti* collected in adult mosquito traps. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1241–1243, 2017.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–96, 1 set. 2015.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood? **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 411–422, 1 maio 2001.

HARRIS, A. F. et al. Field performance of engineered male mosquitoes. **Nature Biotechnology**, v. 29, p. 1034, 30 out. 2011.

HELINSKI, M. E. H.; PARKER, A. G.; KNOLS, B. G. J. Radiation biology of mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 8, n. SUPPL. 2, p. S6, 16 nov. 2009.

HILGENBOECKER, K. et al. How many species are infected with Wolbachia?--A statistical analysis of current data. **FEMS microbiology letters**, v. 281, n. 2, p. 215–20, abr. 2008.

HOFFMANN, A. A. et al. Stability of the wMel Wolbachia Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3115, 11 set. 2014.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 4, p. 393–405, 1 ago. 2000.

JOHNSON, B. J. et al. Development and field evaluation of the sentinel mosquito arbovirus capture kit (SMACK). **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015.

JOHNSON, B. J. et al. Field comparisons of the Gravid Aedes Trap (GAT) and BG-Sentinel Trap for Monitoring *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and notes on indoor GAT collections in Vietnam. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 2, p. 340–348, 2016.

KATO, H. et al. Leishmania species identification using FTA card sampling directly from patients' cutaneous lesions in the state of Lara, Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 561–567, 1 out. 2011.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F. History of the Sterile Insect Technique. In: **Sterile Insect Technique**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 3–36.

KNIPLING, E. F. Sterile-male method of population control. **Science (New York, N.Y.)**, v. 130, n. 3380, p. 902–4, 9 out. 1959.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, p. e08347, 30 jun. 2015.

KUNO, G.; CHANG, G.-J. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of

Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 3 abr. 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, ago. 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 5, p. 933–5, maio 2016.

LEDERMANN, J. P. et al. *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3188, out. 2014.

LEE, V. H.; MOORE, D. L. Vectors of the 1969 yellow fever epidemic on the Jos Plateau, Nigeria. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 5, p. 669–673, 1972.

LEES, R. S. et al. Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 156–162, 2015.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 1, p. 61–66, 1 maio 2009.

LI, C. C. et al. Persistence of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried-blood samples on FTA filter paper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3847–3849, ago. 2004.

LI, M. I. et al. Oral Susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1792, 28 ago. 2012.

LI, Y. et al. Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

LIU, Z. et al. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes as Zika virus vectors, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, p. 1085–1091, jul. 2017.

LOTHROP, H. D. et al. Use of Scented Sugar Bait Stations to Track Mosquito-Borne Arbovirus Transmission in California. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 6, p. 1466–1472, nov. 2012.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1 mar. 1954.

MARANO, G. et al. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and Transfusion Medicine. **Blood Transfusion**, v. 14, n. 2, p. 95–100, mar. 2016.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1 maio 1969.

MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, n. February, p. i720, 2016.

MCELROY, K. L. et al. Characterization of the Antigen Distribution and Tissue Tropisms of Three Phenotypically Distinct Yellow Fever Virus Variants in Orally Infected *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 675–688, 6 out. 2008.

MCMENIMAN, C. J. et al. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 323, n. 5910, p. 141–4, 2 jan. 2009.

MELANSON, V. R. et al. Improving vector-borne pathogen surveillance: A laboratory-based study exploring the potential to detect dengue virus and malaria parasites in mosquito saliva. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 54, n. 4, p. 301–310, 2017.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.

MOREIRA, L. A. et al. Human Probing Behavior of *Aedes aegypti* when Infected with a Life-Shortening Strain of *Wolbachia*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. e568, 15 dez. 2009.

MORLAN, H. B.; MCCRAY, E. M. . J.; KILPATRICK, J. W. Field Tests with Sexually Sterile

Males for control of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 22, n. 3, p. 295–300, 1962.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, p. 20761, 10 abr. 2014.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, fev. 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, jul. 2016.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 1 out. 2014.

NGUYEN, T. H. et al. Field evaluation of the establishment potential of Wolbachia in Australia and Vietnam for dengue control. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 563, 28 dez. 2015.

O'NEILL, S. L. The use of Wolbachia by the world mosquito program to interrupt transmission of *Aedes Aegypti* transmitted viruses. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.].

O'NEILL, S. L. et al. Scaled deployment of Wolbachia to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses. **Gates Open Research**, v. 2, p. 36, 1 nov. 2018.

OLAFUYI, O.; BADHAN, R. K. S. Dose Optimization of Chloroquine by Pharmacokinetic Modeling During Pregnancy for the Treatment of Zika Virus Infection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 1, p. 661–673, 2018.

OLIVA, C. F. et al. The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating Vigour of Sterilized Males. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49414, 21 nov. 2012.

OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.

PARIDA, M. M. et al. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 351–7, 1 fev. 2007.

PAUPY, C. et al. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1177–1185, 1 dez. 2009.

PEPIN, K. M. et al. Cost-effectiveness of novel system of mosquito surveillance and control, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 542–550, 2013.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

PICARD-MEYER, E.; BARRAT, J.; CLIQUET, F. Use of filter paper (FTA®) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 140, n. 1–2, p. 174–182, 1 mar. 2007.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. August, p. 11–17, 2013.

RAI, K. S.; GROVER, K. K.; SUGUNA, S. G. Genetic manipulation of *Aedes aegypti*: incorporation and maintenance of a genetic marker and a chromosomal translocation in natural populations. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 48, n. 1, p. 49–56, 1973.

RAMÍREZ, A. L. et al. Mosquito excreta: A sample type with many potential applications for the investigation of Ross River virus and West Nile virus ecology. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006771, 31 ago. 2018.

REY, J. R.; O'CONNELL, S. M. Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Influence of congeners and of oviposition site characteristics. **Journal of Vector Ecology**, v. 39, n. 1, p. 190–196, 2014.

ROMOSER, W. S. et al. Evidence for Arbovirus Dissemination Conduits from the Mosquito (Diptera: Culicidae) Midgut. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 467–475, 1 maio 2004.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC microbiology**, v. 7, p. 9, 30 jan. 2007.

- SHAN, C. et al. Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 170–172, 11 mar. 2016.
- SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 335–338, 1 jul. 1964.
- SLENCZKA, W. Zika Virus Disease. In: **Emerging infections 10**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. v. 4p. 163–173.
- SOARES-PINHEIRO, V. C. et al. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Braz. J. Biol. Braz. J. Biol**, v. 77, n. 2, p. 396–401, 2017.
- SOARES, F. A. et al. Estudo Do Comportamento De Oviposição Do *Aedes Aegypti* Em Dois Bairros Sob a Influência Do Clima Semiárido No Município De Salinas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 77–88, 2015.
- SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, n. September 2018, p. 191–209, 2018.
- TERZIAN, A. C. B. et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16034, 30 dez. 2018.
- THOMÉ, R. C. A.; YANG, H. M.; ESTEVA, L. Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and insecticide. **Mathematical Biosciences**, v. 223, n. 1, p. 12–23, 1 jan. 2010.
- TURELL, M. J.; KAY, B. H. Susceptibility of selected strains of Australian mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Rift Valley fever virus. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 2, p. 132–5, mar. 1998.
- TURLEY, A. P. et al. Wolbachia infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 9, p. e516, 15 set. 2009.
- VAN DEN HURK, A. F. et al. Expectoration of Flaviviruses during sugar feeding by mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 5, p. 845–50, set. 2007.

VAN DEN HURK, A. F. et al. Evolution of mosquito-based arbovirus surveillance systems in Australia. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 325659, 2012a.

VAN DEN HURK, A. F. et al. Impact of Wolbachia on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1892, 1 nov. 2012b.

VASIREDDI, M. et al. A novel antiviral inhibits Zika virus infection while increasing intracellular glutathione biosynthesis in distinct cell culture models. **Antiviral Research**, v. 161, n. September 2017, p. 46–52, 2019.

VILELA, A. P. P. et al. Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 989–992, 2010.

WEGER-LUCARELLI, J. et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005101, 26 out. 2016.

WERMELINGER, E. D. et al. *Aedes aegypti* eggs oviposited on water surface collected from field ovitraps in Nova Iguaçu City, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 770–772, 2015.

WISE DE VALDEZ, M. R. et al. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 4772–5, 22 mar. 2011.

WONG, P. S. J. et al. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. 1–5, 2013.

XI, Z.; KHOO, C. C. H.; DOBSON, S. L. Wolbachia establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. **Science (New York, N.Y.)**, v. 310, n. 5746, p. 326–8, 14 out. 2005.

XU, M. Y. et al. Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 236, p. 93–97, 2016.

YAKOB, L.; ALPHEY, L.; BONSALE, M. B. *Aedes aegypti* control: The concomitant role of competition, space and transgenic technologies. **Journal of Applied Ecology**, v. 45, n. 4, p.

1258–1265, 1 ago. 2008.

YEAP, H. L. et al. Dynamics of the "popcorn" Wolbachia infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. **Genetics**, v. 187, n. 2, p. 583–95, fev. 2011.

YU, I. M. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, 2008.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 9 jun. 2015.