



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

ANDRÉIA DA COSTA PAZ

AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DE POPULAÇÕES DE *Aedes albopictus*
DE MANAUS, AMAZONAS AO ZIKA VÍRUS

MANAUS
2018

ANDRÉIA DA COSTA PAZ

AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DE POPULAÇÕES DE *Aedes albopictus* DE MANAUS, AMAZONAS AO ZIKA VÍRUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Orientador: Prof^a Dra Maria das Graças Vale Barbosa Guerra
Coorientador: Dr Paulo Filemon Paolucci Pimenta

MANAUS
2018

ANDRÉIA DA COSTA PAZ

AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DE POPULAÇÕES DE *Aedes albopictus* DE MANAUS, AMAZONAS AO ZIKA VÍRUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: 27/03/2018

Banca Examinadora:

Dr. Vanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Dra. Maria Paula Gomes Mourão
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD/AM

Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

**MANAUS
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

D348a Paz, Andréia da Costa
Avaliação da competência vetorial de populações de *Aedes albopictus* de Manaus, Amazonas ao Zika vírus / Andréia da Costa Paz. Manaus : [s.n], 2018.
45 f.: color.; 30 cm.

Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.
Inclui bibliografia
Orientador: Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra
Coorientador: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

1. Arbovirose. 2. Suscetibilidade. 3. Replicação viral. 4. Competência. 5. Vetor. I. Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.). II. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação da competência vetorial de populações de *Aedes albopictus* de Manaus, Amazonas ao Zika vírus

Dedicatória

A minha família, porto seguro e razão pelo qual cheguei até aqui. Com carinho para minha mãe Julieta, minha irmã Juliana, meu irmão Junior, meu sobrinho Neto e ao meu pai Gerson (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Estado do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia por onde pude realizar este Mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas pela bolsa concedida.

Aos meus orientadores, Dra. Graça Barbosa e Dr. Paulo Pimenta por toda ajuda, apoio, confiança e oportunidades oferecidas ao longo do mestrado.

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, juntamente a Gerência de Entomologia e Gerência de Virologia pela estrutura para o desenvolvimento deste projeto, e a todos aqueles que fazem parte da Entomologia: pesquisadores, técnicos, alunos e colaboradores.

A Bióloga doutoranda Bárbara Chaves, por toda ajuda, paciência, colaboração e por ser uma colaboradora excepcional neste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Evelyn Vaz, Ademir Bentes e Eloane Andrade que sempre me ajudaram e me deram forças nos experimentos, e também a Dra. Ana Paula Duarte, por toda a colaboração, parceria e troca de experiências.

A todos do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou, obrigada pela ajuda em todas as etapas do trabalho e principalmente pelo carinho ao longo das semanas em Belo Horizonte.

As grandes amizades que o mestrado me proporcionou, pela turma maravilhosa do MBT 2016.

E a minha família e meus amigos que tanto me apoiam e me incentivaram em todos os momentos, o meu muito obrigada.

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) causa uma arbovirose com ampla distribuição mundial transmitida ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos infectados. *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são considerados os principais vetores, por serem amplamente distribuídas particularmente na região tropical onde o vírus é prevalente. Embora *Ae. albopictus* seja típico de ambientes silvestres, esta espécie também é encontrada adaptada ao ambiente urbano. Em Manaus sua ocorrência é registrada desde 2002, contudo não se sabe o seu papel na dinâmica de transmissão do ZIKV. Para ser considerado um bom vetor o mosquito deve apresentar competência vetorial, que envolve a suscetibilidade do mosquito em tornar-se infectado por um vírus, replicá-lo e transmiti-lo. Estudos sobre a competência vetorial do gênero *Aedes* para o ZIKV são amplos, porém com resultados divergentes. Para *Ae. albopictus*, no Brasil, apenas um estudo foi realizado com uma população do Rio de Janeiro, não havendo informações sobre a competência vetorial dessa espécie na cidade de Manaus. Este trabalho teve como objetivo avaliar a competência vetorial de uma população de *Aedes albopictus* da cidade de Manaus ao ZIKV. O trabalho foi realizado no laboratório de entomologia da Fundação de Medicina Tropical. Fêmeas de *Ae. albopictus* foram expostas ao vírus através de alimentação artificial e, para fins de comparação, uma população de *Ae. aegypti* foi utilizada como grupo controle. As taxas de infecção e disseminação do vírus foram analisadas através do corpo e cabeça, por RT-qPCR, após dissecação no 7º, 14º e 21º dia pós-infecção (dpi). A análise da transmissão para determinação da competência vetorial ocorreu no 14º dia pós-infecção a partir da coleta da saliva e quantificação por RT-qPCR. A população de *Ae. albopictus* de Manaus se mostrou suscetível a infecção ao ZIKV apresentando valores similares ao observado para o grupo controle formado por uma população de *Ae. aegypti*, avaliado nos mesmos dias pós infecção. Apresentou taxas de infecção de 65% no 7º dpi e 70% no 14º e 21ºdpi. As taxas de infecção disseminada foram de 23% no 7º dpi, 57% no 14º e 14% no 21ºdpi. A competência vetorial foi de 30% no 7º dpi, 40% no 14º e 10% no 21ºdpi. A transmissão do vírus foi observada em 30% dos 10 espécimes de *Ae. albopictus* analisadas. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a população de *Ae. albopictus* de Manaus é suscetível ao ZIKV, permitindo replicação ao longo dos dias pós-infecção; as taxas de infecção foram altas e similares ao observado para *Ae. aegypti*, principal vetor do ZIKV no mundo. Além de ser suscetível, *Ae. albopictus* demonstrou ainda que houve a disseminação do vírus até as glândulas salivares, demonstrando que a população de *Ae. albopictus* na cidade de Manaus apresenta a competência vetorial como vetor do Zika vírus. A grande distribuição geográfica e a alta adaptabilidade de *Ae. albopictus* tornam o seu potencial de transmissão um indicativo de atenção à medida que o surto de ZIKV continua.

Palavras-chave: Arbovirose, suscetibilidade, replicação viral, competência, vetor.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) causes an arbovirose with widespread worldwide distribution transmitted to humans by the bite of females of infected mosquitoes. *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are considered the main vectors, being widely distributed particularly in the tropical region where the virus is prevalent. Although *Ae. albopictus* is typical of wild environments, this species is also found adapted to the urban environment. In Manaus its occurrence has been recorded since 2002, however its role in the ZIKV transmission dynamics is unknown. To be considered a good vector the mosquito must have vector competence, which involves the susceptibility of the mosquito to become infected by a virus, to replicate it and to transmit it. Studies on the vectorial competence of the genus *Aedes* for the ZIKV are wide, but with divergent results. For *Ae. albopictus* in Brazil, only one study was carried out with a population of Rio de Janeiro, and there was no information on the vectorial competence of this species in the city of Manaus. This work aimed to evaluate the vectorial competence of a population of *Aedes albopictus* from the city of Manaus to the ZIKV. The work was carried out in the entomology laboratory of the Tropical Medicine Foundation. Females of *Ae. albopictus* were exposed to the virus through artificial feeding and, for comparison purposes, a population of *Ae. aegypti* was used as control group. Rates of virus infection and dissemination were analyzed through the body and head by RT-qPCR, after dissection on the 7th, 14th and 21st day post-infection. Transmission analysis to determine vector competence occurred on the 14th day post-infection from saliva collection and quantification by RT-qPCR. The population of *Ae. albopictus* from Manaus was susceptible to infection with ZIKV, presenting values similar to that observed for the control group formed by a population of *Ae. aegypti* evaluated on the same days post infection. It presented infection rates of 65% in the 7th dpi and 70% in the 14th and 21st dpi. The rates of disseminated infection were 23% in the 7th dpi, 57% in the 14th and 14% in the 21dpi. Vector competence was 30% in the 7th dpi, 40% in the 14th and 10% in the 21st. Transmission of the virus was observed in 30% of the 10 *Ae. albopictus* analyzed. The results obtained in this study demonstrated that the *Ae. albopictus* from Manaus is susceptible to ZIKV, allowing replication over the post-infection days; infection rates were high and similar to that observed for *Ae. aegypti*, the main vector of the ZIKV in the world. In addition to being susceptible, *Ae. albopictus* also showed that the virus had spread to the salivary glands, demonstrating that the population of *Ae. albopictus* in the city of Manaus presents the vectorial competence as vector of the Zika virus. The great geographic distribution and the high adaptability of *Ae. albopictus* make their transmission potential an indication of attention as the outbreak of ZIKV continues.

Keywords: Arbovirose, susceptibility, viral replication, competence, vector.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Mapa da distribuição dos registos do Zika vírus no mundo ao longo dos anos	12
Figura 2 – Imagem esquemática dos diferentes sintomas da Febre do Zika, Dengue e Chikungunya	14
Figura 3 – Imagem esquemática da estrutura do ZIKV, proteínas estruturais e não estruturais	16
Figura 4 – Imagem de um adulto de <i>Aedes albopictus</i>	18
Figura 5 – Esquema geral das barreiras de infecção de um mosquito	22

CAPÍTULO I

Figura 1 – Demonstração da suscetibilidade entre <i>Aedes albopictus</i> e <i>Aedes aegypti</i> a infecção pelo ZIKV em diferentes dias pós-infecção. dpi=dia pós infecção.....	33
Figura 2 – Desenvolvimento da infecção por ZIKV ao longo de diferentes dias pós infecção em <i>Ae. albopictus</i> . dpi=dia pós infecção	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Zika Vírus.....	11
2.1.1	Breve Histórico e distribuição espacial.....	11
2.1.2	Formas de Transmissão	13
2.1.3	Sintomas da doença	14
2.1.4	Patogênese	14
2.1.5	Diagnóstico	14
2.1.6	Tratamento	15
2.2	Agente Etiológico.....	16
2.3	Vetores.....	17
2.3.1	<i>Aedes aegypti</i>	17
2.3.2	<i>Aedes albopictus</i> (SKUSE 1894)	18
2.4	Interação vetor e patógeno.....	21
2.4.1	Competência vetorial.....	22
2.5	Controle e Prevenção	23
2.6	Relevância do estudo	24
3	OBJETIVO GERAL	25
3.1	Objetivos específicos	25
4	CAPÍTULO I.....	26
5	CONCLUSÃO	34
6	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses (*Arthropod Borne Viruses*) são mantidas na natureza através da transmissão biológica entre artrópodes hematófagos vetores e hospedeiros vertebrados suscetíveis, ou por transmissão transovariana e possivelmente venérea em artrópodes (WEAVER e REISEN, 2010), onde a maioria dos vetores de arbovírus são insetos hematófagos pertencentes à ordem Diptera, principalmente mosquitos e flebotomíneos (HIGGS e BEATY, 2004). São reconhecidas como doenças virais de importância médica, e sua crescente incidência nas últimas décadas é o resultado de uma variedade de fatores como a urbanização, o rápido crescimento da população humana, a distribuição cada vez maior de vetores, o aumento no fluxo de viagens de pessoas entre regiões endêmicas a não endêmicas, e o aquecimento global (CLETON et al. 2012).

Nos últimos 10 anos, em diferentes países das Américas, tem-se observado a emergência de inúmeras arboviroses, e, no Brasil, atualmente, entre as arboviroses que apresentam maior circulação estão o Dengue, o Chikungunya e a febre do Zika vírus (BRASIL, 2017), sendo esta última de grande destaque devido à recente epidemia, em 2015, e as complicações neurológicas associadas ao vírus (DUCA et al. 2017).

É, portanto, de grande relevância a execução de estudos sobre a dinâmica da doença, com destaque sobre os vetores comprovados e vetores em potencial do ZIKV, assim como na interação patógeno-vetor, como importantes ferramentas no suporte ao controle da doença (WONG et al. 2013).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Zika Vírus

2.1.1 Breve Histórico e distribuição espacial

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, causador de uma arbovirose, que foi isolado pela primeira vez em um macaco *Rhesus*, em 1947 na Floresta Zika, na Uganda. Em 1948, na mesma localidade, esse vírus foi isolado pela primeira vez em mosquitos *Aedes africanus* (DICK, 1952).

Em 1954 o vírus foi isolado pela primeira vez em seres humanos na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Posteriormente Simpson (1964) descreveu o quadro clínico da infecção, demonstrando que o vírus promove o desenvolvimento de um quadro febril leve de curta duração acompanhado de erupção maculopapular generalizada.

Nos anos seguintes o vírus dispersou-se ao longo dos continentes Africano e Asiático, e por seis décadas apenas 14 casos foram registrados, todos ocorridos na Ásia e África: Malásia (MARCHETTEN et al. 1969), Gabão (JAN et al. 1978), Serra Leoa (ROBIN e MOUCHET, 1978), Nigéria (FAGBAMI, 1979), República Central da África (SALUZZO et al. 1981), Indonésia (OLSON et al. 1981), Uganda (MCCRAE e KIRYA, 1982), Paquistão (DARWISH et al. 1983), Senegal (MONLUN et al. 1993) e Costa do Marfim (AKOUA-KOFFI et al. 2001).

Em 2007 a primeira epidemia fora da África e Ásia ocorreu nas Ilhas Yap, na Federação dos Estados da Micronésia, onde estima-se que aproximadamente 70% da população foi infectada (LANCIOTTI et al. 2008). Novos casos ressurgiram em 2013 na Polinésia Francesa e, de 2013 a 2014, disseminou-se para as Ilhas Cook, Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e em toda a região do Pacífico (MUSSO et al. 2014) (Figura 1). No Brasil foi confirmada transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika a partir de abril de 2015 (ZANLUCA et al. 2015).

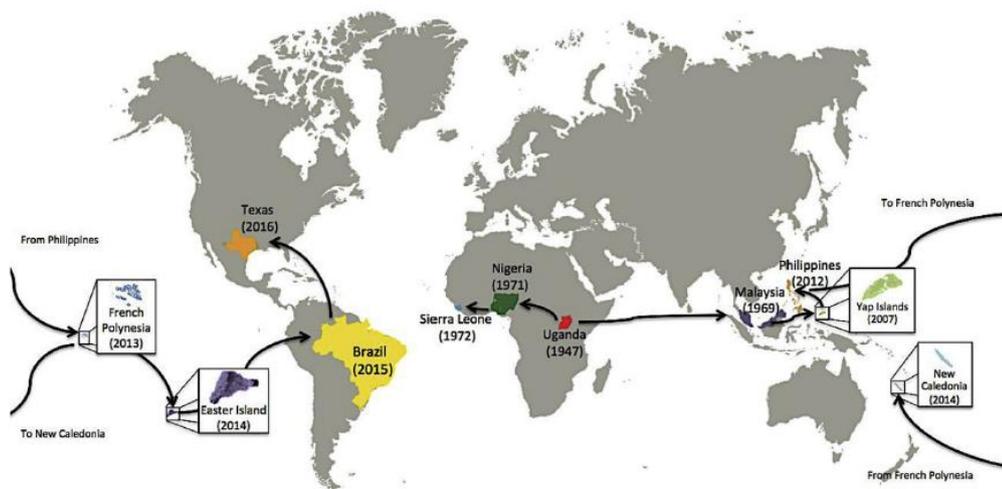


Figura 1. Mapa da distribuição dos registros do Zika vírus no mundo ao longo dos anos.

Em 2017, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 220 mil casos foram registrados no mundo. No Brasil em 2016, mais de 216 mil casos prováveis de febre pelo ZIKV foram registrados. Contudo, em 2017, observou-se uma diminuição significativa no número de casos da doença, onde 17.452 casos prováveis foram registrados, e deste número, somente metade foram confirmados (BRASIL, 2017).

A região norte registrou os primeiros casos da doença ainda em 2015, e assim como as demais regiões brasileiras, também apresentou uma queda significativa no número de notificações da doença. Em 2016 foram mais de 12 mil casos foram registrados na região, deste número 4.485 ocorreram no estado do Amazonas. Em 2017, 2.201 casos prováveis foram registrados, 429 no estado do Amazonas (BRASIL, 2017).

A cidade de Manaus confirmou o primeiro caso de Zika em novembro de 2015, e desde então, de acordo com a Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS-AM), concentra o maior número de casos do estado do Amazonas. Em 2017, 337 casos foram registrados, uma redução de quase 90% quando comparado com o ano de 2016, onde 4.405 casos foram registrados no município (BRASIL, 2017).

2.1.2 Formas de Transmissão

A principal forma de transmissão do vírus é através da picada de mosquitos infectados, onde as fêmeas, durante o repasto sanguíneo, inoculam o vírus presente na saliva em um hospedeiro vertebrado (MUSSO e GUBLER, 2016).

Dois ciclos de transmissão do ZIKV podem ocorrer, um ciclo silvestre envolvendo primatas não-humanos e mosquitos silvestres, e um ciclo urbano/suburbano envolvendo seres humanos e mosquitos do gênero *Aedes* (MUSSO e GUBLER, 2016), sendo bem aceito que o vírus, em seu ciclo urbano, tem como vetores principais as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (HUANG et al. 2016). Alguns estudos demonstraram o isolamento do vírus em 17 espécies do gênero *Aedes*, incluindo *Aedes africanus* (DICK et al. 1952), *Aedes apicoargenteus* (MCCRAE e KIRYA, 1982), *Aedes luteocephalus* e *Aedes vittatus* (DIALLO et al. 2011). Espécies de mosquitos de outros gêneros, também já foram indicados como possíveis vetores tais como: *Anopheles gambiae* (ALTHOUSE et al. 2015), *Anopheles coustani* (FAYE et al. 2013), *Mansonia uniformis*, *Culex perfuscus* (DIALLO et al. 2011). A indicação de *Culex quinquefasciatus* como vetor tem gerado discussões sobre o real papel desta espécie na transmissão do vírus, uma vez que os estudos realizados apresentam divergências nos resultados (FERNANDES et al. 2016; GUEDES et al. 2017; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al. 2017).

Além da transmissão através da picada, outras formas de transmissão também vêm sendo indicadas, entre elas a transmissão sexual, a transmissão através do sangue e do leite materno. Contudo o potencial destas outras formas de transmissão ainda não está plenamente esclarecido (MUSSO et al. 2015; MUSSO et al. 2014; DUPONT-ROUZEYROL et al. 2016).

2.1.3 Sintomas da doença

Essa arbovirose se manifesta com sintomas clínicos semelhantes aos de outras importantes infecções, como a dengue e chikungunya (Figura 2), e incluem febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dores nos músculos e nas articulações, mal-estar ou dor de cabeça; e, normalmente, duram de 2 a 7 dias (OMS, 2016). Por vezes muitas pessoas infectadas com o Zika vírus não apresentam sintomas ou apresentam apenas sintomas leves (CDC, 2016).



Figura 2. Imagem esquemática dos diferentes sintomas da Febre do Zika, Dengue e Chikungunya.

2.1.4 Patogênese

A patogênese de ZIKV é pouco conhecida, no entanto, verificou-se que flavivírus transmitidos por mosquitos replicam-se inicialmente em células dendríticas perto do local da inoculação, em seguida espalha-se para os gânglios linfáticos e sangue, podendo distribuir-se a partir dos vasos linfáticos e corrente sanguínea para infectar outros órgãos do corpo, como o miocárdio, sistema nervoso central, músculos esqueléticos e, em gestantes, para o feto (HAMEL et al. 2015; CARNEIRO e TRAVASSOS, 2016; REZA et al. 2016).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de infecção com o ZIKV é complicado devido as semelhanças dos sintomas com os causados por outras febres arbovirais agudas, além do fato do ZIKV

compartilhar insetos vetores e distribuição geográfica com dengue e chikungunya (KELSER, 2016), tornando difícil a determinação da verdadeira incidência e prevalência da doença.

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na detecção de RNA viral no soro do paciente através de método de Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (ZIKV RT-PCR) visando o gene do envelope ou a região NS5, sendo este último altamente conservado entre os flavivírus em comparação com os genes do envelope (ECDC, 2015), no entanto o período virêmico curto do vírus no ser humano limita a utilidade desta técnica em amostras de soro para uma janela de aproximadamente 3-5 dias após o início da infecção (RABAAN et al. 2016). O diagnóstico sorológico também pode ser realizado a partir dos anticorpos IgM/IgG específicos de ZIKV, detectados por Elisa e ensaios de imunofluorescência em amostras de soro a partir do dia 5-6 da doença, no entanto, em indivíduos com antecedentes de infecção por outros flavivírus a possibilidade de reação cruzada é alta (PAHO, 2016). O isolamento de ZIKV em cultura viral em células Vero é o padrão-ouro do diagnóstico laboratorial de infecções virais, mas depende principalmente do tempo de coleta de amostras e cargas virais nos espécimes, podendo ser inoculadas com amostras de soro, urina ou sêmen dos pacientes infectados (MUSSO et al. 2015; CHAN et al. 2016).

2.1.6 Tratamento

A febre do vírus Zika não exige tratamento específico, as pessoas doentes devem repousar muito, beber muitos líquidos e tratar a dor e a febre (OMS, 2016). No entanto, estudos indicam a associação do vírus a complicações neurológicas como microcefalia, uma forma congênita do vírus que gera danos cerebrais em filhos de mulheres grávidas infectadas (CHANG et al. 2016), a Síndrome de Guillain-Barré, uma síndrome de origem autoimune e de ordem neurológica que causa fraqueza muscular generalizada e paralisia (OEHLER et al. 2014), além de outras complicações neurológicas como encefalite, meningoencefalite e mielite (ECDC, 2015).

2.2 Agente Etiológico

O ZIKV é um arbovírus filogeneticamente muito próximo de outros vírus, tais como dengue, febre amarela, encefalite japonesa e vírus do Nilo Ocidental (PAHO, 2016), e composto por três linhagens principais: Africano Oriental, Africano Ocidental e Asiático (FAYE et al. 2014), sendo o genótipo asiático o responsável pela atual expansão da ZIKV nas Américas (CHOUIN-CARNEIRO, 2016).

É um vírus de RNA sentido positivo, de cadeia simples, com um genoma de 10.794 nucleotídeos codificando 3.419 aminoácidos (LINDENBACH e RICE, 2003). Após ligação e entrada na célula, o genoma do RNA viral é liberado para o citoplasma e traduzido no retículo endoplasmático em uma única poliproteína, onde proteases virais e hospedeiras clivam esta poliproteína em 3 proteínas estruturais: Capsídeo (C), Precursor de Membrana (prM/M) e Envelope (E); e 7 proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (BARTENSCHLAGER e MILLER, 2008) (Figura 3).

A proteína estrutural “E” é a principal glicoproteína de superfície de flavivírus, e está envolvida em vários aspectos do ciclo viral, mediando a ligação e fusão da membrana (LINDENBACH e RICE, 2003). As proteínas não estruturais NS3 e NS5 codificam atividades enzimáticas essenciais para a reprodução viral (YE et al. 2016). Muitas das funções das proteínas não estruturais permanecem pouco conhecidas, mas podem ter papéis específicos essenciais em vários estágios de replicação (CHANG et al. 2016).

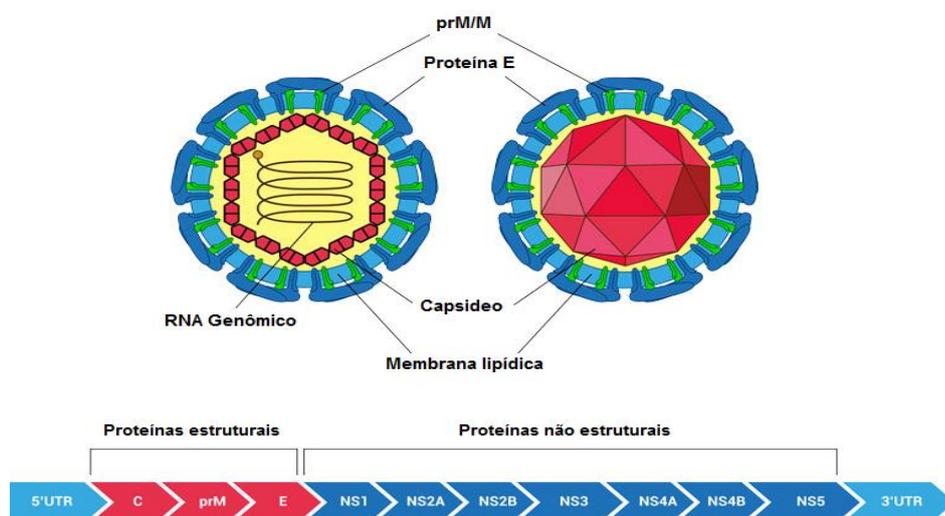


Figura 3. Imagem esquemática da estrutura do ZIKV, proteínas estruturais e não estruturais.

2.3 Vetores

Para que uma espécie seja incriminada como vetor de um agente etiológico, ela deve ser capaz de se infectar com um determinado patógeno via oral, resistir à replicação deste no seu interior e transmiti-lo a um hospedeiro susceptível (GUEDES, 2012). Para o ZIKV existe um consenso global entre cientistas e agências de saúde de que *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são os principais vetores em áreas urbanas (OMS, 2016). *Ae. albopictus* pode coexistir na mesma região e utilizar criadouros de características semelhantes que *Ae. aegypti*, no entanto, observa-se uma superioridade de *Ae. albopictus* durante a competição interespecífica (BRAKS et al. 2004).

Diversos estudos já avaliaram o potencial de *Ae. aegypti* como vetor do ZIKV (BOORMAN e PORTERFIELD, 1956; CORNET et al. 1979; LI et al, 2012; DIAGNE et al. 2015; CHOUIN-CARNEIRO et al. 2016). Por apresentar comportamento antropofílico, hábito doméstico e ser geralmente abundante, mosquitos do gênero *Culex*, especialmente *Culex quinquefasciatus*, tornaram-se alvo de estudos indicando a possível contribuição da espécie para a transmissão do ZIKV (FERNANDES et al. 2016; GUEDES et al. 2017; LOURENÇO DE OLIVEIRA et al. 2017), no entanto os resultados permanecem ainda em discussão, tendo em vista as divergências observadas.

2.3.1 *Aedes aegypti*

É uma espécie, originária da África, que se espalhou para áreas neotropicais nos séculos XVII e XVIII, tendo a urbanização como o principal fator, o que facilitou o aumento das populações através da proliferação de contêineres de uso humano usados para armazenar água nas áreas habitadas e ao redor delas, o que proporciona o ambiente favorável para o desenvolvimento da espécie (EPELBOIN et al. 2017).

Suspeita-se que a introdução dessa espécie na América tenha ocorrido no período colonial, entre os séculos XVI e XIX, durante o comércio de escravos (CONSOLI e LOUREÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), disseminando-se a partir de então ao longo da faixa tropical. É considerado um vetor predominantemente urbano, utilizando uma diversidade de recipientes artificiais como criadouros de larvas e alimentando-se quase que exclusivamente em seres humanos (POWELL e TABACHNICK, 2013), o que beneficia sua ampla dispersão,

favorecida nos ambientes urbanos, preferencialmente no intra e no peridomicílio humano (ZARA et al., 2016). Estudos demonstraram que a espécie apresentou baixas taxas ou mesmo nenhuma transmissão vírus, indicando a possibilidade de outras espécies de mosquitos como vetores na disseminação do ZIKV (DIAGNE et al. 2015).

2.3.2 *Aedes albopictus* (SKUSE 1894)

Pertence a ordem Diptera, família Culicidae, *Ae. albopictus*, popularmente conhecido mosquito-tigre asiático, é uma espécie invasora que pode ser encontrada atualmente na Ásia temperada e tropical (sua área de origem), Europa, América do Norte e do Sul, África e um número de locais no Oceano Pacífico e Índico (PAUPY et al. 2009).

Desde 1985 tem sido assinalado no continente americano, seguido dos primeiros registros no Brasil, nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais em 1986, provavelmente por introdução passiva por meio do comércio marítimo de minério de ferro (CONSOLI e LOURENÇO, 1994).

No Estado do Amazonas a espécie foi encontrada pela primeira vez em 1996 nas imediações do município de Tabatinga conforme informações da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SUSAM), de onde foi eliminada temporariamente; e no município de Manaus foi registrado no ano de 2002 ao ser encontrado na área externa do campus da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FÉ et al. 2003).

Essa espécie apresenta como características morfológicas a coloração escura, tórax recoberto de escamas escuras e claras, e a presença de linha longitudinal mediana, larga e de escamas prateadas (FORATTINI, 2002) (Figura 4).



Figura 4. Imagem de um adulto de *Aedes albopictus*.

Apresenta desenvolvimento completo, dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. O ciclo de vida varia de 4 a 9 dias sob temperatura média de 25°C (FORATTINI, 2002). O tempo de crescimento e o desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro (GUEDES, 2012).

As fêmeas preferem se reproduzir e depositarem seus ovos em reservatórios de água limpa, embora possam se adaptar às novas situações impostas pelo homem (BESERRA et al., 2009). Os ovos são depositados próximos à linha d'água, mais raramente, sobre ela, ou ainda em recipientes possivelmente inundáveis (SERPA, 2014). O fato de não depositar seus ovos diretamente na água permite o processo de diapausa na fase de ovo, caracterizada por uma suspensão temporária da eclosão após o término do desenvolvimento embrionário; e, quando colocados em contato com a água, desencadeiam o processo de eclosão das larvas dando início ao ciclo de desenvolvimento (CONSOLI e LOUREÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As larvas são sempre aquáticas, têm aspecto vermiforme (CONSOLI e LOUREÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) e sofrem três ecdises, culminando com a larva de quarto estágio que dará origem a pupa (FORATTINI, 2002). As pupas têm aspecto de vírgula (CONSOLI e LOUREÇO DE OLIVEIRA, 1994) e durante esta fase, que corresponde geralmente de dois a três dias, não há alimentação e suas formas inativas mantêm-se na superfície da água, flutuando, o que facilita a emergência do inseto adulto (LEANDRO, 2012).

Os adultos são alados e se alimentam de seivas de flores e frutos, como fonte de carboidratos necessários para o metabolismo energético; as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para maturação dos ovos (GUEDES, 2012).

O hábito hematofágico das fêmeas, associado à antropofilia resulta em características favoráveis para a veiculação de patógenos, e, em determinadas situações, a expansão de doenças (FORATTINI, 2002).

Diferentemente de *Ae. aegypti*, as fêmeas de *Ae. albopictus* são oportunistas e alimentam-se na maioria dos grupos de vertebrados, incluindo, além de mamíferos, répteis, aves e anfíbios (SCHOLTE e SCHAFFNER, 2007). Desta forma, devido ao seu comportamento oportunista essa espécie pode se tornar uma ponte entre os ciclos silvestres e urbano de arboviroses devido a sua capacidade de adaptação em ambientes diversos (GOMES et al. 1999).

Ae. albopictus possui uma forte plasticidade ecológica, o que permite sua rápida adaptação a uma grande variedade de habitats (PAUPY et al. 2009). A espécie tem preferência por em ambientes rurais, semissilvestres e silvestres, mas apresenta ampla capacidade ecológica, sendo capaz de colonizar os mais variados tipos de recipientes, naturais e artificiais (ALENCAR et al. 2008).

Ae. albopictus apresenta uma contínua expansão global gerando uma preocupação crescente de como este mosquito pode alterar a dinâmica de transmissão de doenças arbovirais e aumentar os riscos de seres humanos a infecções virais transmitidas por mosquitos (LAMBRECHTS et al. 2010), demonstrando a importância do conhecimento do seu potencial como vetor, especialmente frente a arboviroses em expansão como o ZIKV.

O ZIKV foi isolado nessa espécie pela primeira vez em 2007 (GRARD et al. 2014). Com as novas epidemias novos estudos voltados a suscetibilidade da espécie ao vírus foram realizados (ALIOTA et al. 2016; CHOUIN-CARNEIRO et al. 2016; LUCA et al. 2016; HEITMANN et al. 2017; LIU et al. 2017), demonstrando resultados diferentes quanto a suscetibilidade da espécie nas diferentes localidades.

Além disso, estudos de isolamento viral e de competência vetorial mostraram que *Ae. albopictus* é um vetor eficiente de 26 arbovírus em laboratório pertencentes as famílias Flaviviridae, Togaviridae, Bunyaviridae, Reoviridae e Nodaviridae, devendo-se levar em consideração seu forte potencial como vetor de arboviroses (PAUPY et al. 2009).

2.4 Interação vetor e patógeno

No ciclo de transmissão das flavivirose, no hospedeiro vertebrado, infectado a partir da picada de um vetor (mosquito), estima-se que o vírus se replique em um intervalo de tempo denominado Período de Incubação Intrínseco, podendo nesta fase infectar um novo vetor a partir do repasto sanguíneo (ABUSHOUK et al. 2016). Para o ZIKV, este período varia de 3 a 12 dias, onde, após ser inoculado pelo vetor, replica-se em diferentes células da pele humana permissivas ao vírus (fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas), podendo a partir daí disseminar-se para outras células, resultando nas manifestações clínicas causadas pelo vírus (HAMEL et al. 2015).

No mosquito após o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o arbovírus deve inicialmente infectar as células epiteliais do intestino médio do vetor, nele as partículas virais interagem com os receptores das células epiteliais do intestino médio e penetram nas células, disseminando-se para hemocele, podendo então infectar as glândulas salivares (BLACK et al. 2002; SALAZAR et al. 2007). O intervalo de tempo, epidemiologicamente relevante, que compreende entre a ingestão do sangue contaminado com o patógeno pelo vetor e sua transmissão para outro hospedeiro vertebrado a partir de uma nova alimentação sanguínea é conhecido por período de incubação extrínseca (PIE) (HIGGS e BEATY, 2004). Em laboratório, este período é de aproximadamente 10 dias para o ZIKV (KAUFFMAN e KRAMER, 2017), podendo permanecer no mosquito por até 60 dias (BOORMAN e PORTERFIELD, 1956), e depende tanto de fatores ambientais como temperatura e umidade, bem como de fatores intrínsecos como competência vetorial e dose infectante do vírus (BLACK *et al.*, 2002; HALSTEAD, 2007).

Quanto menor o PIE, maior será o tempo que o vetor será capaz de transmitir o vírus para um hospedeiro sadio, aumentando assim as chances de transmissão da doença (SALAZAR et al., 2007).

No entanto, a simples detecção de um vírus no mosquito não o incrimina como um vetor. É importante provar em condições laboratoriais que um organismo é capaz de adquirir o patógeno, mantê-lo e transmiti-lo a outros hospedeiros, onde, mesmo que a capacidade de uma determinada espécie de transmitir um patógeno seja comprovada em condições de laboratório, essa espécie não é necessariamente o vetor primário (AYRES, 2016).

2.4.1 Competência vetorial

A competência vetorial define-se como a habilidade do mosquito em tornar-se infectado por um vírus, replicá-lo e transmiti-lo (KRAMER e EBEL, 2003), e está associada a algumas das barreiras anatômicas dos mosquitos aos arbovírus (Figura 5), capazes de impedir a replicação e disseminação do vírus para as glândulas salivares tais como: a barreira de infecção do intestino (Midgut Infection Barrier - MIB), a barreira de escape do intestino (Midgut Escape Barrier - MEB) e a barreira das glândulas salivares (Barreira de Transmissão) (HIGGS e BEATY, 2004). Se o arbovírus estiver bloqueado nos estádios iniciais da infecção do intestino médio, isto é considerado uma barreira de infecção do intestino médio (MIB); se os vírions infecciosos não se disseminam para hemocele (não infectando órgãos alvo secundários), isto é considerado uma barreira de escape do intestino médio (MEB) (BLACK et al. 2002). É calculada dividindo-se o número de fêmeas com as cabeças infectadas pelo número de fêmea expostas ao vírus (BENNET et al. 2002).

Outros fatores devem ainda ser levados em consideração, como a Taxa de Infecção (TI) e taxa de Infecção Disseminada (TID). A Taxa de Infecção baseia-se na divisão do número total de fêmeas com os corpos positivos pelo número de fêmeas expostas ao vírus; já a Taxa de Infecção Disseminada (TID) consiste na divisão do número de fêmeas com a cabeça positiva pelo número de fêmeas com o corpo positivo (BENNET et al. 2002).

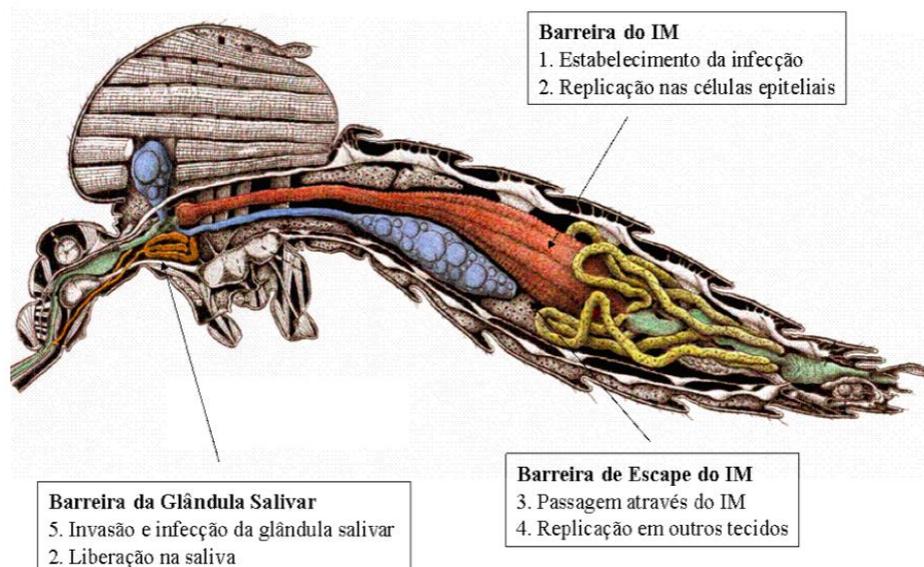


Figura 5. Esquema geral das barreiras de infecção de um mosquito.

Os mosquitos mantêm a competência vetorial através de uma série de adaptações fisiológicas e bioquímicas que permitem que a replicação viral ocorra nas células epiteliais do intestino médio, e, além dos fatores de virulência do arbovírus individual, a probabilidade de transmissão do vírus está sujeita à capacidade vetorial, que depende da densidade, da taxa de picada e da taxa de sobrevivência do vetor (VALDERRAMA et al. 2017).

Os estudos sobre competência vetorial para flavivirose são vastos, principalmente para vírus da dengue. Para ZIKV, estes estudos vêm sendo realizados quase que exclusivamente sobre o gênero *Aedes*, e apresentam resultados divergentes, como taxas de transmissão muito altas (WONG et al. 2013; POMPOM et al. 2017) ou muito baixas (LUCA et al. 2016; HEITMANN et al. 2017), mosquitos altamente suscetíveis (WONG et al. 2013) ou taxas de infecção baixas (CHOUIN-CARNEIRO et al. 2016), indicando a necessidade de mais estudos sobre a dinâmica de transmissão do vírus.

2.5 Controle e Prevenção

Com a contínua expansão do DENV e a recente introdução do ZIKV para as Américas, houve um novo impulso para o desenvolvimento de vacinas e antivirais contra flavivírus, no entanto, o controle da atividade arboviral ainda depende em grande parte do controle dos vetores (KAUFFMAN e KRAMER, 2017).

As melhores perspectivas para o controle do vírus Zika dependem da redução do contato entre o vetor e seres humanos suscetíveis, sendo dessa forma a abordagem mais eficaz para reduzir esse contato a eliminação ou redução das populações de mosquitos (WEAVER, 2016).

Ferramentas mais novas e inovadoras também estão sendo visadas como o uso de mosquitos transgênicos e machos esterilizados por radiação (ROBINSON et al 2009; AGEEP et al. 2014). Outra abordagem explora a bactéria natural *Wolbachia*, usada em uma super-infecção de mosquitos *Aedes* causando ovos não viáveis nas fêmeas (JOUBERT et al. 2016).

2.6 Relevância do estudo

O gênero *Aedes* representa um problema frente às epidemias de arboviroses atuais, tais como o Zika vírus que causa doença com características similares as da dengue, porém com complicações graves, e que corresponde a elevados números de casos no Brasil.

Apesar de *Ae. aegypti* ser considerado o principal vetor do Zika vírus no Brasil deve-se levar em consideração o papel do *Ae. albopictus* como vetor secundário do vírus, onde a capacidade de adaptação da espécie ao ambiente, assim como seu oportunismo alimentar, e sua suscetibilidade a diferentes vírus em laboratório, refletem seu grande potencial como vetor do ZIKV. Para *Ae. albopictus* ser definido como vetor do ZIKV, precisa ser comprovada a sua competência vetorial, que consiste na sua susceptibilidade à infecção pelo por um vírus, replicá-lo, e transmiti-lo a um hospedeiro vertebrado a partir do repasto sanguíneo. Apesar de muitos estudos determinarem a competência vetorial de mosquitos do gênero *Aedes*, pouco se sabe sobre a interações do vírus com os vetores nas Américas. Portanto, tendo em vista a relevância epidemiológica do ZIKV no Brasil se faz necessário estudos sobre a transmissão do vírus nos vetores circulantes na região.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a competência vetorial de populações de *Aedes albopictus* da cidade de Manaus ao Zika vírus.

3.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a suscetibilidade de *Ae. albopictus* à infecção ao ZIKV.
2. Verificar a taxa de infecção (TI), competência vetorial (CV) e a taxa de infecção disseminada (TID) de *Ae. albopictus* ao ZIKV.
3. Avaliar o potencial de *Ae. albopictus* na transmissão do ZIKV.

4 CAPÍTULO I**AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DE
POPULAÇÕES DE *Aedes albopictus* DE MANAUS,
AMAZONAS AO ZIKA VÍRUS**

AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DE POPULAÇÕES DE *Aedes albopictus* DE MANAUS, AMAZONAS AO ZIKA VÍRUS

Paz, A. C.¹; Chaves, B. A.²; Secundino, N. F. C.³; Pimenta, P. F. P.³; Guerra, M. G. V. B.^{1,2}

1 Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas.

2 Gerência de Entomologia. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas.

3 Laboratório de Entomologia Médica. Instituto de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Resumo

Para ser considerado um bom vetor o mosquito deve apresentar competência vetorial, que envolve a sua susceptibilidade em tornar-se infectado por um vírus, replicá-lo e transmiti-lo. Estudos sobre a competência vetorial do gênero *Aedes* para o ZIKV são amplos, porém com resultados divergentes. Para *Ae. albopictus*, no Brasil, apenas um estudo foi realizado em população de mosquitos do Rio de Janeiro. Em Manaus sua ocorrência é registrada desde 2002, contudo não se sabe o seu papel na dinâmica de transmissão do ZIKV. Este trabalho teve como objetivo avaliar a competência vetorial de uma população de *Aedes albopictus* da cidade de Manaus ao ZIKV. O trabalho foi realizado no laboratório de entomologia da Fundação de Medicina Tropical. Fêmeas de *Ae. albopictus* foram expostas ao vírus através de alimentação artificial e, para fins de comparação, uma população de *Ae. aegypti* foi utilizada como grupo controle. As taxas de infecção e disseminação do vírus foram analisadas através do corpo e cabeça, por RT-qPCR, após dissecação no 7º, 14º e 21º dia pós-infecção (dpi). A análise da transmissão para determinação da competência vetorial ocorreu no 14º dia pós-infecção a partir da coleta da saliva e quantificação por RT-qPCR. A população de *Ae. albopictus* de Manaus se mostrou suscetível a infecção ao ZIKV apresentando valores similares ao observado para o grupo controle formado por uma população de *Ae. aegypti* avaliado nos mesmos dias pós infecção. Apresentou taxas de infecção de 65% no 7º dpi e 70% no 14º e 21ºdpi. As taxas de infecção disseminada foram de 23% no 7º dpi, 57% no 14º e 14% no 21ºdpi. A competência vetorial foi de 30% no 7º dpi, 40% no 14º e 10% no 21ºdpi. A transmissão do vírus foi observada em 30% dos 10 espécimes de *Ae. albopictus* analisados. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a população de *Ae. albopictus* de Manaus é suscetível ao ZIKV, permitindo replicação ao longo dos dias pós-infecção; as taxas de infecção foram altas e similares ao observado para *Ae. aegypti*, principal vetor do ZIKV no mundo. Além de ser suscetível, *Ae. albopictus* demonstrou ainda que houve a disseminação do vírus até as glândulas salivares, indicando que a população de *Ae. albopictus* na cidade de Manaus apresenta competência vetorial como vetor do Zika vírus. A grande distribuição geográfica e a alta adaptabilidade de *Ae. albopictus* tornam o seu potencial de transmissão um indicativo de atenção à medida que o surto de ZIKV continua.

Palavras-chave: Arbovirose, susceptibilidade, replicação viral, competência, vetor.

INTRODUÇÃO

A competência vetorial de uma espécie é definida como a permissividade intrínseca de um vetor para infecção, replicação e transmissão de um vírus (COX et al. 2011), e é um componente essencial na capacidade vetorial de uma determinada espécie, definida, de modo geral, pela taxa de eficiência da transmissão do patógeno pela população local de vetores (LEANDRO, 2012). A competência depende da interação do arbovírus com a resposta inata do vetor e requer passagem através de diferentes barreiras físicas e moleculares presentes no mosquito (VALDERRAMA et al. 2017), barreiras essas capazes de impedir que o vírus se replique e se dissemine para as glândulas salivares, o que pode afetar consideravelmente a competência vetorial (BLACK et al. 2002).

Entre mosquitos de diferentes espécies e entre cepas de vírus, sabe-se que a competência vetorial difere (LIU et al. 2017). Além das barreiras físicas outros fatores extrínsecos como temperatura, período de incubação extrínseco, dose de infecção e estado nutricional do adulto pode influenciar na competência vetorial (KRAMER e EBEL, 2003).

A principal forma de transmissão do ZIKV é através da picada de mosquitos infectados, onde as fêmeas injetam o vírus presente na saliva infecciosa durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (MUSSO e GUBLER, 2016). Indica-se a existência de dois ciclos de transmissão do ZIKV, um ciclo silvestre envolvendo primatas não-humanos e mosquitos silvestres, e um ciclo urbano/suburbano envolvendo seres humanos e mosquitos do gênero *Aedes* (MUSSO e GUBLER, 2016).

Existe um consenso global entre cientistas e agências de saúde de que *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são os principais vetores do ZIKV em áreas urbanas (OMS, 2016). Vários fatores incriminam o mosquito *Ae. aegypti* como o vetor primário de ZIKV, devido o fato da espécie estar totalmente adaptada ao ambiente urbano, o que proporciona condições para o desenvolvimento do mosquito, e pela espécie se mostrar competente na transmissão do vírus (EPELBOIN et al. 2017). *Aedes albopictus*, espécie originária da Ásia, atua como vetor secundário na transmissão do ZIKV, e os efeitos da espécie sobre a saúde pública por muito tempo foram minimizados, tendo em vista que a espécie é mais comumente encontrada no ambiente silvestre (LAMBRECHTS et al. 2010). Contudo a espécie apresenta ampla plasticidade ecológica, sendo capaz de colonizar os mais variados tipos de recipientes, naturais e artificiais (ALENCAR et al. 2008).

Estudos experimentais confirmaram que outros mosquitos do gênero *Aedes*, incluindo *Ae. vittatus* e *Ae. luteocephalus*, podem atuar como vetores do ZIKV (DIAGNE et al. 2015;

CHOUIN-CARNEIRO et al. 2016), assim como outras espécies de mosquitos, como *Cx. quinquefasciatus*, que coexiste com *Ae. aegypti* nas áreas urbanas, o que poderiam contribuir para a transmissão ZIKV (GUEDES et al. 2017). Entretanto, a competência vetorial (capacidade de infecção, disseminação e transmissão de vírus) difere entre mosquitos de diferentes espécies e entre cepas de vírus (LIU et al. 2017).

No Brasil já foi demonstrado a suscetibilidade de uma população de *Ae. albopictus* do Rio de Janeiro ao ZIKV, em laboratório (CHOUIN-CARNEIRO et al. 2016), e, em campo, foram coletados no estado da Bahia ovos de *Ae. albopictus* infectados com o vírus (SMARTT et al. 2017). O isolamento de um vírus em um mosquito, no entanto, não é evidência de que seja um vetor, sendo necessário a comprovação da sua capacidade de transmitir o vírus (MUSSO e GLUBER, 2016).

Em comparação com *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* apresenta comportamento oportunista (PAUPY et al. 2009). Associado a isso está a sua contínua expansão global, o que torna a espécie uma preocupação crescente, tendo em vista que pode alterar a dinâmica de transmissão de doenças arbovirais e aumentar os riscos de humanos para infecções virais transmitidas por mosquitos (LAMBRECHTS et al. 2010), especialmente frente a arboviroses em expansão, como o ZIKV.

A competência vetorial de *Ae. albopictus* foi bem estabelecida para outras arboviroses como Dengue e Chikungunya, em populações da Europa e das Américas (VEGA-RUA et al. 2013; VEGA-RUA et al. 2014), mas a transmissão do ZIKV permaneceu a ser esclarecida no início do surto americano porque poucos estudos demonstraram claramente a capacidade dessa espécie de transmitir o vírus (EPELBOIN et al. 2017). Sabe-se que identificar vetores e compreender o mecanismo de transmissão é o primeiro passo na concepção da política de controle vetorial mais adequada (DUCHEMIN et al. 2017).

Ae. albopictus foi registrado pela primeira vez em Manaus em 2002 (FÉ et al. 2003), posteriormente a espécie disseminou-se pelo município, sendo encontrado em diversos bairros, e mais abundantemente nos bairros com maiores áreas verdes (RÍOS-VELÁSQUEZ et al. 2007), contudo não há informações para a cidade de Manaus sobre o papel da espécie na dinâmica de transmissão do ZIKV. O objetivo deste trabalho foi avaliar a competência vetorial de uma população de *Aedes albopictus* da cidade de Manaus ao Zika vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo Estudo realizado no laboratório de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) localizado na cidade de Manaus, Amazonas, e no Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais.

População de mosquitos Ovos de *Aedes albopictus* proveniente de coletas realizadas no campus da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, na cidade de Manaus, Amazonas, em Novembro de 2015, com o auxílio de ovitrampas; e ovos de *Aedes aegypti* provenientes de uma colônia estabelecida em laboratório (linhagem PP-Campos), e que se encontravam armazenados na Gerência de Entomologia FMT-HVD, foram postos para eclosão e cuidados para se tornarem adultos. Os adultos foram mantidos a temperatura 26-28°C, umidade de 70 a 80%, alimentados com glicose a 10%, e a alimentação sanguínea foi realizada em camundongo do tipo suíço.

Vírus O vírus (ZikaSPH2015, isolado no ano de 2015) foi multiplicado em cultura de células C6/36 cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15), contendo 20µg/mL de gentamicina, 5µg/mL de anfotericina B, 200U/mL de penicilina e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), e mantidos em estufa a 25°C. A titulação do vírus utilizado na infecção foi realizada através da quantificação de uma alíquota da cultura de células por RT-qPCR.

Inativação do sistema complemento Como fonte alimentar para infecção foi utilizado sangue de camundongo heparinizado inativado. O sangue, coletado por punção cardíaca imediatamente antes da alimentação artificial, foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos, o plasma foi separado e em seguida levado ao banho-maria a 56°C por 1 hora. Após a inativação o plasma foi misturado ao sangue, juntamente com uma suspensão do vírus, em uma proporção de 1:3.

Infecção experimental A alimentação com glicose das fêmeas foi suspensa 24h antes da infecção. Um grupo de 500 fêmeas entre 4-7 dias de idade de *Ae. albopictus* foram submetidas a infecção através de alimentação artificial por membrana, que consiste em pequenos recipientes de vidro (alimentadores) semelhantes a funis invertidos com capacidade de 300-500 µl, conectados através de mangueiras. Cada alimentador foi revestido, na parte inferior, com membrana artificial de Parafilm, e preenchido com sangue heparinizado inativado. A manutenção da temperatura dos alimentadores (38-40°C) foi realizada através de um equipamento de banho-maria, por um sistema no qual a água aquecida circula entre os recipientes, através das mangueiras, impulsionada por uma bomba do tipo aquário. As fêmeas

foram submetidas a alimentação por aproximadamente três horas. Para fins de comparação um grupo controle com 250 fêmeas de *Ae. aegypti* também foi submetido a infecção com o Zika vírus seguindo a mesma metodologia descrita. Após a alimentação as fêmeas ingurgitadas foram separadas em novas gaiolas e mantidas a temperatura 26-28°C, umidade de 70 a 80% e alimentadas com glicose a 10%.

Processamento dos mosquitos Para avaliar a suscetibilidade e competência vetorial dos mosquitos aos ZIKV grupos de 10-20 fêmeas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, escolhidas aleatoriamente, foram dissecadas no 7°, 14° e 21° dia pós-infecção (dpi). A dissecação consistiu em separar cabeça, contendo a glândula salivar, e corpo, utilizando estiletes e com o auxílio de um microscópio estereoscópio.

Quantificação do ZIKV A cabeça e corpo dos mosquitos foram macerados, individualmente e então processados para extração do RNA viral utilizando kit de extração de RNA (Quiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa com produção de cDNA foi realizada utilizando um iniciador aleatório e enzima M-MLV, e subsequente teste de qPCR baseado em TaqMan para ZIKV como descrito por Lanciotti et al. (2008). Todas as reações foram executadas em duplicata com controles positivos e negativos e uma curva padrão que possui seis pontos com o intervalo de 3 a 3×10^5 cópias. Os resultados foram analisados através da curva de melting, garantindo a especificidade dos produtos amplificados (~78,6 °C) com um ciclo de quantificação (Cq) valor a 35 por comparação com a curva padrão. A partir das análises por RT-qPCR quantificou-se o número de cópias virais, por dpi para as duas espécies, sendo os resultados das taxas de infecção demonstrados em porcentagem.

Análise da competência vetorial Realizada segundo Bennett et al. (2002) com o cálculo da taxa de Taxa de Infecção (T.I), Taxa de Infecção Disseminada (T.I.D) e Competência Vetorial (C.V).

Análise do potencial de transmissão A avaliação da possibilidade da transmissão do vírus foi observada a partir da extração da saliva das fêmeas. As fêmeas foram anestesiadas em gelo e inicialmente removeu-se as pernas e asas; em seguida inseriu-se a probóscide em uma ponteira de 10 µL contendo 6µL de uma solução açucarada mais soro fetal bovino, em uma proporção de 1:1. Esse processo foi realizado no 14° dpi, e uma hora após uma alimentação de uma solução açucarada mais soro fetal bovino, especifica para esse procedimento; as soluções contendo a saliva foram acondicionadas em microtubo e armazenadas a -80°C para posterior análise e quantificação do vírus por RT-qPCR.

Análises estatísticas Foram aplicados os testes de normalidade Shapiro Wilk e Teste de Mann Whitney para determinação da modelagem dos dados e avaliar a significância e diferenças entre os grupos em relação à quantidade viral. Os testes foram realizados no programa Stata 13.0, com nível de confiança de 95%.

Considerações éticas Esse projeto fez parte de um projeto maior sob título Xenomonitoramento e caracterização da competência vetorial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* ao Zika vírus em Manaus, submetido e aprovado pela Comissão de ética com uso de animais conforme Processo de N°. 002380/2016.

RESULTADOS

Avaliação da suscetibilidade de *Ae. albopictus* a infecção por ZIKV

Observou-se uma taxa de infecção de 30% nas 10 fêmeas de *Ae. albopictus* testadas no 7º dpi, taxa um pouco menor ao observado nos 10 espécimes de *Ae. aegypti*, que apresentaram uma infecção de 50%. A partir do 14º dpi observou-se o aumento nas taxas de infecção das duas espécies, ambas apresentaram taxas de 70% ($p > 0,05$). Além do aumento na infecção observou-se também um aumento no número de cópias virais em *Ae. albopictus*. No 21º dpi, a infecção permaneceu alta para ambas espécies com 70% e 80% respectivamente, observando-se uma diminuição no número de cópias virais em *Ae. albopictus* entre o 14º e 21º dpi, diferentemente do observado para *Ae. aegypti* que apresentou similaridade no número de cópias virais entre os períodos pós-infecção testados (Figura 1).

Análise da Taxa de Infecção, Taxa de Infecção Disseminada e Competência Vetorial

Além de ser suscetível ao Zika vírus *Ae. albopictus* apresentou similaridades no desenvolvimento da infecção no corpo, apresentando taxas de infecção elevadas nos três dias pós-infecção: 65% no 7ºdpi, 75% no 14ºdpi e 70% no 21ºdpi ($p > 0,05$). Na cabeça observou-se a disseminação do vírus, as taxas mantiveram-se similares ao longo dos dois primeiros dias pós-infecção: 30% no 7ºdpi e 40% no 14ºdpi, havendo uma diminuição para 10% no 21ºdpi ($p > 0,05$). Observou-se um número de cópias virais menor na cabeça que o observado no corpo em todos os dias pós-infecção testados (Figura 2). A partir destes dados calculou-se a Taxa de Infecção, Taxa de Infecção Disseminada e Competência Vetorial, de acordo com Bennet et al. (2002) (Tabela 1).

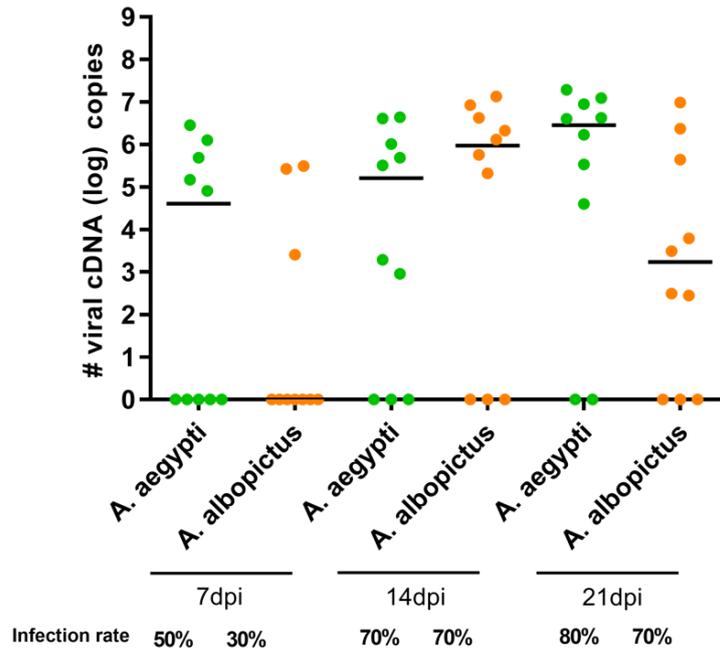


Figura 1. Demonstração da suscetibilidade entre *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* a infecção pelo ZIKV em diferentes dias pós-infecção. dpi=dia pós infecção.

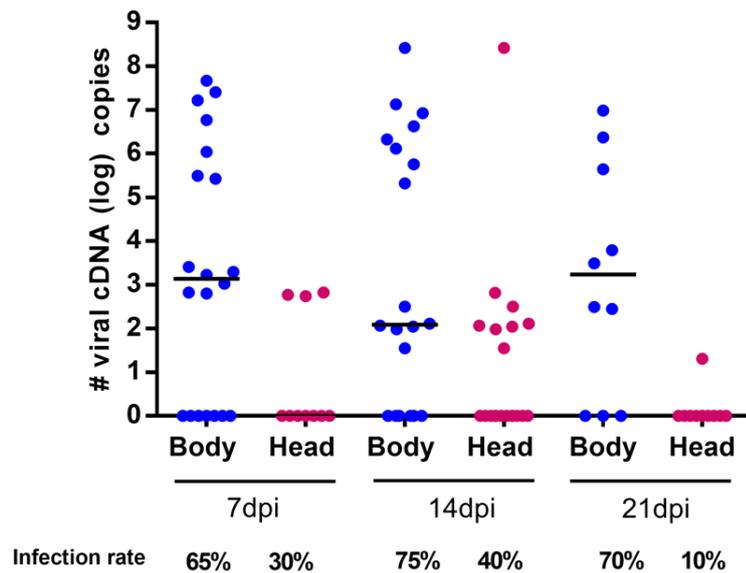


Figura 2. Demonstração do desenvolvimento da infecção por ZIKV em *Ae. albopictus* ao longo de diferentes dias pós infecção. dpi=dia pós infecção.

Tabela 1. Taxas de Infecção, Infecção Disseminada e Competência Vetorial de *Ae. albopictus* ao Zika vírus.

Dias pós-infecção	Taxa de Infecção*	Taxa de Infecção Disseminada**	Competência Vetorial***
7 ^o	13/20 (65%)	3/13 (23%)	3/10 (30%)
14 ^o	14/20 (70%)	8/14 (57%)	8/20 (40%)
21 ^o	7/10 (70%)	1/7 (14%)	1/10 (10%)

* Divisão do número total de fêmeas com os corpos positivos pelo número de fêmeas expostas ao vírus.

** Divisão do número de fêmeas com a cabeça positiva pelo número de fêmeas com o corpo positivo.

*** Divisão do número de fêmeas com as cabeças infectadas pelo número de fêmeas expostas ao vírus.

Avaliação do potencial de transmissão de *Ae. albopictus* ao ZIKV

Foi observada a presença do ZIKV em 30% das salivas dos 10 espécimes de *Ae. albopictus* testados ($p > 0,05$), com número de cópias virais baixos. O grupo controle, formado por uma população de *Ae. aegypti*, nenhuma saliva foi positiva para o vírus ($n=10$).

DISCUSSÃO

A população de *Ae. albopictus* de Manaus demonstrou suscetibilidade à infecção pelo ZIKV, apresentando taxas de infecção quase similares ao observado para *Ae. aegypti* nos dias pós-infecção avaliados. Resultado que difere dos dados de Chouin-Carneiro et al. (2016), que observaram em populações no Rio de Janeiro taxas de infecção ao ZIKV de 20% ($n=30$) em populações de *Ae. albopictus*, e de 80%, ($n=30$) em *Ae. aegypti*.

Outros estudos observaram taxas de infecção mais elevadas no 7^odpi em *Ae. albopictus*, como o demonstrado por Wong et al. (2013), que obtiveram taxas de 91,7% em populações de Singapura, e por Chouin-Carneiro et al. (2016) observaram taxas de 60% em populações dos Estados Unidos, número três vezes maior aos 20% observado para a população do Rio de Janeiro, demonstrando haver diferenças no desenvolvimento da infecção entre populações de uma mesma espécie de localidades diferentes.

Os resultados observados no 14º dpi corroboram com os dados demonstrados em outros estudos de suscetibilidade de populações de *Ae. albopictus* ao ZIKV. Duchemin et al. (2017) e Heitmann et al (2017) obtiveram taxas de infecção em torno de 70% em populações da Austrália e Itália, respectivamente, assim como outros trabalhos (LIU et al. 2017; RYCKEBUSH et al. 2017) demonstraram taxas de infecção elevadas neste período.

O registro das taxas superiores a 50% e similares para ambas espécies após 21º dpi reiteram as divergências já observadas nos poucos estudos que avaliaram o desenvolvimento da infecção pelo ZIKV em populações de *Ae. albopictus* até este período tais como o de Wong et al. (2013) com taxas de infecção de 100%, Heitmann et al. (2017), que observaram taxas de de 50% e Ciota et al. (2017) que encontraram taxa de 33%.

Nos três dias analisados as taxas de infecção permaneceram altas, acima de 60%, no entanto, observa-se uma diminuição quando comparada a taxa de infecção disseminada, principalmente no 7ºdpi (23%) e 21º dpi (14%). O mesmo foi observado por Liu et al. (2017), que demonstraram uma diminuição de quase 50% entre as taxas de infecção e infecção disseminada em populações de *Ae. albopictus* da China. No entanto, não se observa o mesmo comportamento para o vírus da dengue, onde estudos realizados com populações de *Ae. albopictus* do Brasil demonstraram que as taxas de infecção e infecção disseminada permanecem elevadas (superiores a 60%) no decorrer dos dias pós-infecção (GUEDES, 2012).

A diminuição após taxas de infecção altas sugere que a infecção por ZIKV pode induzir uma resposta imune que pode levar à diminuição dos níveis virais (DIAGNE et al. 2015). Além disso, ressalta-se que a cinética da infecção pode ser influenciada pelas barreiras anatômicas do mosquito, onde a barreira de escape do intestino médio dificulta a capacidade do vírus para sair e se disseminar para outros tecidos, apesar da replicação viral no intestino médio, mesmo para títulos elevados do vírus (COX et al. 2011).

Os estudos de competência vetorial avaliam a capacidade de uma espécie em se infectar, replicar e ser capaz de transmitir o vírus, podendo, desta forma, uma espécie ser considerada um vetor. Os resultados demonstram uma competência vetorial satisfatória no 14º dpi na população de *Ae. albopictus* de Manaus ao ZIKV. Embora o 21º dpi tenha apresentado competência de 10% deve-se levar em consideração que a competência vetorial é um componente da equação da capacidade vetorial, que ressalta que um vetor, mesmo que pouco competente, pode vir a conduzir uma transmissão intensa de flavivírus (e outros patógenos transmitidos por vetores) se as outras condições incluídas na equação da capacidade vetorial

forem favoráveis (KRAMER e EBEL, 2003), indicando que mesmo neste estágio da infecção a espécie pode ser competente ao vírus.

Estudos já foram conduzidos em diferentes localidades para a avaliação da competência vetorial de *Ae. albopictus* ao ZIKV (ALIOTA et al. 2016; CHOUI-CARNEIRO et al. 2016; LUCA et al. 2016; HEITMANN et al. 2017; LIU et al. 2017), demonstrando diferenças na infecção e disseminação do vírus, como discutido anteriormente. Esses trabalhos ocorreram em condições similares a este estudo, realizados em condições de laboratório e utilizando-se o método de alimentação artificial por membrana, apesar de apresentarem diferenças significativas entre os resultados. Os muitos estudos que avaliam a competência vetorial de espécies do gênero *Aedes* ao ZIKV são difíceis de comparar devido o uso de populações diferentes, incluindo populações colonizadas e de campo, diferentes linhagens do vírus, diferentes doses na alimentação artificial infecciosa (por vezes anormalmente altas ou baixas) e oferta de alimentação sanguínea (KAUFFMAN e KRAMER, 2017). Tais fatores podem produzir taxas de infecção significativamente maiores e podem afetar a disseminação e transmissão do vírus (EPELBOIN et al. 2017).

Diversos outros determinantes podem afetar a competência vetorial, como fatores genéticos do vetor e do vírus e fatores extrínsecos, como temperatura, período de incubação extrínseca, dose de infecção, estado nutricional do adulto (KRAMER e EBEL, 2003), abundância da população de mosquitos, densidade da população humana, preferências de alimentação e taxas de picada (LUCA et al. 2016).

Ao se analisar a transmissão de um vírus dois fatores são levados em consideração: a eficiência da transmissão (divisão do número de salivas positivas pelo número total de mosquitos testados) e a taxa de transmissão (divisão do número de salivas positivas pelo número de corpos positivos) (JUPILLE et al. 2016). Este trabalho obteve uma eficiência de transmissão de 30% (n=10), valor superior ao observado na literatura: 3,3% (n=30) em populações dos Estados Unidos (CHOUI-CARNEIRO et al. 2016) e 4% (n=24) em populações da França (JUPILLE et al. 2016), o que pode ser influenciado pela diferença de comportamento entre mosquitos de clima temperado e de regiões tropicais, como demonstrado por Vega-Rua et al. (2014) para Chikungunya, assim como a pela interação genética entre o mosquito e o vírus (FANSIRI et al. 2013).

A taxa de transmissão do ZIKV em populações *Ae. albopictus* foi avaliada em diferentes estudos conduzidos na Europa e Ásia no 14º dpi, apresentando resultados variados: como taxas de transmissão altas: 100% em populações de Singapura (WONG et al. 2013) e 76,9% em populações da Austrália (DUCHEMIN et al. 2017) e taxas de transmissão mais

baixas, inferiores a 30% (LUCA et al. 2016; HEITMANN et al. 2017; LIU et al. 2017; RYCKEBUSCH et al 2017), demonstrando haver diferenças na transmissão em populações da mesma espécie em diferentes localidades.

Diferentemente do observado na literatura (RICHARD et al. 2016; RYCKEBUSCH et al. 2017), neste trabalho a população de *Ae. aegypti* não apresentou o vírus na saliva, sendo este um resultado não esperado neste estudo, demonstrando a necessidade de novos experimentos para melhores avaliações.

Os resultados apresentados neste estudo ressaltam, portanto, o potencial da população de *Ae. albopictus* da cidade de Manaus como vetor do ZIKV. A suscetibilidade, competência vetorial e potencial de transmissão da espécie, associados com sua adaptação ao ambiente urbano no município (RÍOS-VELÁSQUEZ et al. 2007) e ao seu comportamento oportunista (SCHOLTE e SCHAFFNER, 2007) demonstram a necessidade de maior atenção a espécie, tendo em vista o seu potencial de atuar na dinâmica de transmissão do vírus na cidade de Manaus.

5 CONCLUSÃO

Avaliação da suscetibilidade de *Ae. albopictus* à infecção ao ZIKV.

Foi demonstrado que a população de *Ae. albopictus* de Manaus é suscetível ao ZIKV, permitindo replicação do vírus ao longo dos dias pós-infecção.

Verificação da taxa de infecção (TI), taxa de infecção disseminada (TID) competência vetorial (CV) de *Ae. albopictus* ao ZIKV.

A população de *Ae. albopictus* da cidade de Manaus apresentou taxas de infecção de 65% no 7º dpi e 70% no 14ºdpi e 21ºdpi. Taxas de infecção disseminada de 23% no 7º dpi, 57% no 14ºdpi e 14% no 21ºdpi. E competência vetorial de 30% no 7º dpi, 40% no 14º dpi e 10% no 21ºdpi.

Avaliação do potencial de *Ae. albopictus* na transmissão do ZIKV.

Ae. albopictus apresentou potencial de transmissão do ZIKV, demonstrando que 30% das salivas foram positivas ao vírus.

6 REFERÊNCIAS

ABUSHOUK, A. I.; NEGIDA, A.; AHMED, H. An updated review of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 84, p. 53–58. 2016.

AGEEP, T. B. et al. Participation of irradiated *Anopheles arabiensis* males in swarms following field release in Sudan. **Malar J**, v. 13. 2014.

AKOUA-KOFFI, C. et al. Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Cote d'Ivoire in 1999. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 94 p. 227–230. 2001.

ALENCAR, C. H. M. et al. Potencialidades do *Aedes albopictus* como vetor de arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária. **Rev. APS**, v. 11, n. 4, p. 459-467. Out-Dez. 2008.

ALIOTA, M. T.; PEINADO, S. A.; OSORIO, J. E.; BARTHOLOMAY, L. C. *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* mosquito susceptibility to Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, Out. 2016.

ALTHOUSE, B. M. et al. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. **PLoS Negl Trop Dis**, p. 1–11, 2016.

AYRES, C. F. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancenet**, v. 16, p.278-279. 2016.

BARTENSCHLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Med**, v. 3, p. 155–165. 2008.

BEARCROFT, W. G. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 50, p. 442-448. 1956.

BENNETT, K. E. et al. Variation In Vector Competence For Dengue 2 Virus Among 24 Collections Of *Aedes Aegypti* From Mexico And The United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 67, n. 1, p. 85–92. 2002.

BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia Sér Zool**, v. 99, n. 3, p. 281–285, 2009.

BLACK, W. C. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 379–388. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 43. 2017.

BOORMAN, J. P. T.; PORTERFIELD, J.S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses transmission of Zika virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 50, p. 238-242. 1956.

CARNEIRO, L. A.; TRAVASSOS, L. H. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Microbes Infect**, doi: S1286e4579(16)00004-6. 2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Zika vírus**. Disponível em <<http://portugues.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html>> Acesso em 30 Out. 2016.

- CHAN, J. F. W. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, p. 507-524. 2016.
- CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, n. 68. 2016.
- 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. 2016.
- CIOTA, A. T. et al. Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, p. 1110–1117, 2017.
- CLETON, N. B. et al. Syndromic Approach to Arboviral Diagnostics for Global Travelers as a Basis for Infectious Disease Surveillance. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–15, 2015.
- CONSOLI, R.A.G.B; LOURENÇO- DE- OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro. 225pp. 1994.
- CORNET, M. et al. Transmission experimentale comparee du virus amaril et du virus Zika chez *Aedes aegypti*. **Ser Entomol Medicale Parasitol**, v. 17, p. 47-53. 1979.
- COX, J.; BROWN, H. E.; RICO-HESSE, R. Variation in vector competence for dengue viruses does not depend on mosquito midgut binding affinity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. 1–7. 2011.
- DARWISH, M. A. et al. A seroepidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 77, p. 442–445. 1983.
- DICK, G. W. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 46, n. 5, p. 521–34. 1952.
- DIAGNE, C. T. et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 15. n. 492. 2015.
- DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS One**, v.9, e109442. 2014.
- DUCA, L. M. et al. Zika Virus Disease and Associated Neurologic Complications. **Curr Infect Dis Rep**, v. 19, n. 4. 2017.
- DUCHEMIN, J. B. et al. Zika vector transmission risk in temperate Australia: A vector competence study. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2017.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Infectious Zika viral particles in breastmilk. **The Lancet**, doi: 10.1016/S0140-6736(16)00624-3. 2016.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome.** Stockholm: ECDC. 2015.

EPELBOIN, Y.; TALAGA, S.; EPELBOIN, L.; DUSFOUR, I. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0005933. 2017.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **J Hyg**, v. 83 p. 213–219. 1979.

FANSIRI, T. et al. Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. **Plos Genetics**, e1003621, doi:10.1371/journal.pgen.1003621. 2013.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology J**, v. 10, p. 311. 2013.

FÉ, N. F. et al. Registro da ocorrência de *Aedes albopictus* em área urbana do município de Manaus, Amazonas. **Rev Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 2002–2003, 2003.

FERNANDES, R. S. et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, e0004993. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004993>. 2016.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp. 2002.

GOMES, A. C. et al. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. **Rev Saúde Pública**, v. 33, p. 95-7. 1999.

GRARD, G. et al. Zika virus in Gabon (Central Africa) 2007: a new threat from *Aedes albopictus*? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, e2681. 2014.

GUBLER, D.J. et al. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 28, n. 6, p. 1045–52. 1979.

GUEDES, M. L. P. Culicidae (Diptera) no Brasil: Relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 283-296, Jun. 2012.

GUEDES, D. R. D. 2012. **Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco, Recife**. 102 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães–CPqAM da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/MS. Recife.

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

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. **Annual review of entomology**, v. 53, p. 273-291, 2007.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **J Virol**, v. 89, n. 17, p. 8880e96. 2015.

HEITMANN, A. et al. Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. **Euro Surveill**, v. 22. 2017.

HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). **Biology of disease vectors**. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004.

HUANG, Y. S. et al. *Culex* species mosquitoes and Zika Virus. **Vector-borne and zoonotic diseases**, 2016

JAN, C. et al. A serological survey of arboviruses in Gabon. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 71, p.140–146. 1978.

JOUBERT, D. A. et al. Establishment of a *Wolbachia* Superinfection in *Aedes aegypti* Mosquitoes as a potential approach for future resistance management. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 2. e1005434. 2016.

JUPILLE, H. et al. Zika Virus, a New Threat for Europe? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–8, 2016.

KAUFFMAN, E. B.; KRAMER, L. D. Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology, and Vector Control. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S976–S990. 2017.

KELSER, E. A. Meet dengue's cousin, Zika. **Microbes and Infection**, v.18. 163e166, 2016.

KRAMER, L. D.; EBEL, G. D. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 187–232. 2003.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, 2010.

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, p. 1232–1239. 2008.

LEANDRO, R. S. **Competição e dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) em áreas de ocorrência no município de João Pessoa – PB**. 2012. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

LI, M.I. et al. Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, e1792. 2012.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus Res**, v. 59, p. 23–61. 2003.

- LIMA-CÂMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 50, n. 36. 2016.
- LIU, Z. et al. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. **Emerging Infectious Diseases**, as. v. 23, n. 7. 2017.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Culex quinquefasciatus* mosquitoes do not support replication of Zika virus. **Journal of General Virology**, DOI 10.1099/jgv.0.000949. 2017.
- LUCA, M. DI et al. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. **Eurosurveillance**, p. 1–4, 2016.
- 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, 1954.
- MCCRAE, A.W; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 76, p. 552–562. 1982.
- MARCHETTEN N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 18, p. 411–415. 1969
- MONLUN, E. et al. Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 86, p. 21–28. 1993.
- 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, 2014.
- MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 359–361. doi: 10.3201/eid2102.141363. 2015.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, Jul. 2016.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, p. 1-3. 2014.
- OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 75, p. 389–393. 1981.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **Doença do vírus Zika**. 2016. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>> Acesso em 27 Out. 2016.
- PAHO. Pan American Health Organization. **Guideline for Zika virus disease and complications surveillance**. Washington, D.C. 2016.
- PAUPY, C. et al. *Aedes albopictus* , an arbovirus vector : From the darkness to the light. **Microbes and Infection**, v. 11, 2009.

POMPON, J. et al. A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, p. 11-17. 2013.

RABAAN, A. A. et al. Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. **Journal of Infection and Public Health**, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.05.007>. 2016.

REZA, S. et al. Zika virus: A review of literature. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, doi: 10.1016/j.apjtb.2016.09.007. 2016.

RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T. Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis**, p. 1–8, 2016.

RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M. et al. Distribution of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 617-623. 2007.

ROBIN, Y.; MOUCHET, J. Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 68, p. 249–258. 1978.

ROBINSON, A.S.; KNOLS, B. G.; VOIGT, G.; HENDRICH, J. Conceptual framework and rationale. **Malar J**, v. 8, n. 2. 2009.

RYCKEBUSCH, F.; Berthet, M.; Missé, D.; Choumet, V. Infection of a french population of *Aedes albopictus* and of *Aedes aegypti* (Paea strain) with zika virus reveals low transmission rates to these vectors saliva. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11. 2017.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1–13, 2007.

SALUZZO, J. F. et al. Serological survey for the prevalence of certain arboviruses in the human population of the south-east area of Central African Republic. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 74, p. 490–499. 1981.

SCHOLTE, E.J.; SCHAFFNER, F. Waiting the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe, in: W. Takken, B.G.J. Knols (Eds.), **Emerging Pests and Vector-Borne Diseases in Europe**, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. p. 241-260. 2007.

SERPA, L. L. N. 2014. **Ovipoosição de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em município com transmissão de dengue, Estado de São Paulo, Brasil**. 152f. Tese (Doutorado em Ciências). Coordenadoria de Controle de Doenças/SES. São Paulo.

SIMPSON, D. I. Zika Virus Infection In Man. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 58, n.4. 1964.

VALDERRAMA, A.; DIAZ, Y.; LÓPEZ-VERGÈS, S. Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.050. 2017.

VEGA-RUA, A. et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. **PLoS ONE**, v.8, e59716. 2013.

VEGA-RUA, A. et al. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **Journal of virology**, v. 88, n. 11, p. 6294–306, 2014.

WEAVER, S. C; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, p. 328–345. 2010.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, p. 69-80. 2016.

WONG, P. J. et al. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2448. 2013.

YE, Q. et al. Infection , Genetics and Evolution Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **MEEGID**, v. 43, p. 43–49, 2016.

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, 2015.

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, abr-jun. 2016.