

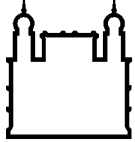
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Competência vetorial de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil

ROSILAINY SURUBI FERNANDES

Rio de Janeiro
Maio de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ROSILAINY SURUBI FERNANDES

Competência vetorial de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

RIO DE JANEIRO

Maio de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT /
FIOCRUZ - RJ

Fernandes, Rosilainy Surubi.

Competência vetorial de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil / Rosilainy Surubi Fernandes. - Rio de Janeiro, 2017.

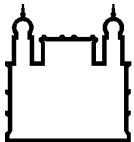
93 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: Ricardo Lourenço de Oliveira.

Bibliografia: f. 74-89

1. vírus Zika. 2. Competência Vetorial. 3. *Culex quinquefasciatus*. 4. *Aedes aegypti*. 5. macacos rhesus. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ROSILAINY SURUBI FERNANDES

Competência vetorial de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

EXAMINADORES:

Titulares

Prof. Dra. Flávia Barreto dos Santos (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Alex Pauvolid Corrêa (IOC/CDC)

Prof. Dra. Tatiana Mingote F. Ázara (PNCMD/SVS/MS)

Suplentes

Prof. Dr. Cláudio Cesar Cirne dos Santos Pessanha (UFF)

Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2017.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e motivação que me deram quando resolvi aprofundar meus estudos iniciando doutorado em outro estado.

Ao meu companheiro de todos os dias, Renato, que foi meu esteio nessa jornada, sempre me ouvindo e aconselhando nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, por ter contribuído para minha formação profissional e pessoal. Sempre serei grata por esta oportunidade.

A todos os integrantes do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários – LATHEMA por me receber, me auxiliar, me compreender, me amparar e me orientar durante todo o curso de doutorado. Em especial Stéphanie S. Campos, Keli A.B. Silva, Rafaella M. Miranda, Iule S. Bonelly, Anielly Ferreira-de-Brito, Filipe V. S. Abreu, Maria Inês Bersot, Cristiane Maria, Dinair Couto, Maycon Neves, Dra. Márcia G. Castro, Dra. Monique Motta, Dra. Teresa Fernandes, Dra. Nildimar Honório, Dr. Rafael Maciel de Freitas.

À Cátia Cabral, José Bento Lima, Cynara Rodovalho, Paulino Siqueira Ribeiro e Maria Inês Bersot por fornecerem alguns dos mosquitos utilizados neste trabalho.

Ao Jeffrey Powell e Maria Goreti Rosa-Freitas pela correção dos manuscritos.

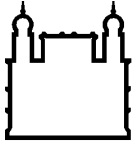
À Dra. Flávia Barreto por aceitar o convite de fazer a revisão desta tese.

Ao Laboratório de Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus Instituto Oswaldo Cruz LABMOF, em especial à Dra. Myrna Bonaldo, Lidiane Raphael, Elaine E. de Moura, Alexandre A.C. dos Santos pela parceria no desenvolvimento dos trabalhos com vírus Zika.

Ao Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, Luciano Moreira, Marli T. Cordeiro e Dra. Myrna Bonaldo por nos fornecer isolados de vírus utilizados neste trabalho.

A Fundação Oswaldo Cruz, a pós-graduação em Biologia Parasitária e a CAPES por terem financiado os meus estudos e o projeto de pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com esta pesquisa. Muito obrigada!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Competência vetorial de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil

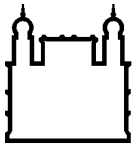
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Rosilainy Surubi Fernandes

O vírus Zika (ZIKV) causou uma grave epidemia no Brasil entre 2015 e 2016, tendo, subsequentemente, se tornado endêmico tanto no território brasileiro quanto em países tropicais e subtropicais das Américas. O ZIKV pode ser transmitido entre humanos, porém acredita-se que a transmissão vetorial desempenhe o principal papel na sua disseminação. O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é considerado o vetor primário do ZIKV no ambiente urbano e suburbano. Porém, a gravidade da epidemia e a velocidade da dispersão viral, levaram à suspeita de que outros mosquitos antropofílicos e muito frequentes no ambiente domiciliar, como *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) pudessem estar associado à esta transmissão. Na região Nordeste (NE) do país, epicentro da epidemia de casos de microcefalia e malformações congênitas associadas ao ZIKV, este vetor é amplamente disseminado. Diante dessa possibilidade, mudanças consideráveis necessitariam ser feitas quanto às estratégias de controle da transmissão vetorial frente às diferenças na biologia do *Ae. aegypti* e do *Cx. quinquefasciatus*. Este trabalho objetivou avaliar a competência vetorial de populações destes mosquitos de diferentes regiões do Brasil, desafiados com distintos isolados brasileiros do ZIKV. Inicialmente, quatro populações de *Cx. quinquefasciatus* do Rio de Janeiro/RJ foram desafiadas oralmente com ds de ZIKV (ZIKVRio-U1 e ZIKVRio-S1), isoladas de pacientes também do RJ e na mesma época em que as colônias desses mosquitos foram geradas. Em um segundo momento, desafiámos, comparativamente, populações de *Cx. quinquefasciatus* de áreas nordestinas (Campina Grande/PB e Recife/PE) com cepas de ZIKV também isoladas do NE [Recife/PE (ZIKVPE243)] e do Sudeste [Rio de Janeiro/RJ (ZIKVRio-U1 e ZIKVRio-S1) e São Paulo/SP (ZIKVSPH2015)]. Populações de *Ae. aegypti* de diferentes áreas do Rio de Janeiro (Urca, Manguinhos, Triagem) foram testados simultaneamente com as mesmas cepas virais. Amostras do corpo, cabeça e saliva dos mosquitos foram examinadas ao 7^o, 14 e 21^o dias pós-infecção, para a

determinação, respectivamente, das taxas de infecção, disseminação e transmissão. A identificação viral foi realizada por inoculação em cultura de células Vero e qRT-PCR. Todas as populações de *Cx. quinquefasciatus* se mostraram incapazes de transmitir o ZIKV, independente da origem do vírus testado. Em contraste, mosquitos *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro revelaram elevadas taxas de infecção, disseminação e transmissão, sendo capazes de transmitir o vírus a partir do 14^o dpi. Em um terceiro momento, avaliamos a competência vetorial de *Ae. aegypti* alimentados diretamente em dois macacos rhesus (*Macaca mulatta*) em diferentes momentos durante o curso de sua infecção experimental com um cepa de ZIKV isolada de sangue humano no Espírito Santo/ES. Os mosquitos só se infectaram ao picar um dos animais no 2^o dia após a inoculação, quando seu soro apresentava carga viral de $1,3 \times 10^4$ PFU/mL, exibindo baixa taxa de infecção e nenhuma disseminação até 14 dpi. Porém, quando desafiados oralmente através de alimentador artificial e com títulos virais mais elevados (10^6 , 10^7 e 10^8 PFU/mL), os mosquitos apresentaram taxas de infecção bem mais baixas (15%) quando desafiados com título de 10^6 PFU/mL, comparados com títulos elevados: 10^7 (70%) e 10^8 (100%). Os resultados indicam que a infecção oral de *Ae. aegypti* é dose dependente e que a prevenção e o controle da transmissão vetorial de ZIKV no Brasil devem focar em esforços contra esse mosquito, o único até agora confirmado como vetor natural e com elevada competência vetorial demonstrada experimentalmente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Vector competence of Brazilian populations of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* against different strains of Zika virus isolated in Brazil

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Rosilainy Surubi Fernandes

The Zika virus (ZIKV) caused a severe epidemic in Brazil between 2015 and 2016, and subsequently became endemic in Brazil and the other tropical and subtropical countries of the Americas. ZIKV can be transmitted between humans, but it is believed that a vector transmission plays the major role in its dispersion. The *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) mosquito is considered the primary vector in the urban and suburban environment. However, the severity of the epidemic and the velocity of ZIKV dispersion led to the suspicion that other common anthropophilic mosquitoes such as *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, could be also associated with ZIKV transmission. In Northeast Brazil, the epicenter of the epidemic of microcephaly and congenital malformations associated with ZIKV, this vector is widely disseminated. If confirmed vector competence of *Cx. quinquefasciatus* considerable changes would be need regarding the strategies of vector control consider the differences between *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* biology. This work has assessed the vectorial competence of populations *Cx. quinquefasciatus* from different regions of Brazil with different Brazilian isolates of the ZIKV. At first, four populations of *Cx. quinquefasciatus* from Rio de Janeiro were challenged orally with two strains of ZIKV (ZIKVRio-U1 and ZIKVRio-S1), isolated from patients from RJ and at the same time as the colonies of mosquitoes has generated. Secondly, we challenged, comparatively, populations of *Cx. quinquefasciatus* from Northeast Brazil (Campina Grande / PB and Recife / PE) with strains of ZIKV also isolated from the same region [Recife / PE (ZIKVPE243)] and also from Southeast [Rio de Janeiro / RJ (ZIKVRio- U1 and ZIKVRio-S1) and São Paulo / SP (ZIKVSPH2015)]. Populations of *Ae. aegypti* from different areas of Rio de Janeiro (Urca, Manguinhos, Triagem) were tested simultaneously with the same strains as infection control. Samples of the body, head and saliva of the mosquitoes were examined at 7, 14 and 21 days after infection (dpi) for a determination, respectively, of infection, dissemination and transmission rates. The viral identification was made by inoculation into Vero cell culture followed by quantitative RT-PCR. All populations of *Cx*

quinquefasciatus were unable to transmit ZIKV, regardless of its origin. In contrast, mosquitoes *Ae. aegypti* from Rio de Janeiro revealed high rates of infection, dissemination and transmission, being able to transmit the virus from the 14th dpi. In a third moment, the vectorial competence of *Ae. aegypti* fed directly on two rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) we tested experimentally with a strain of ZIKV isolated from human blood in the State of Espírito Santo. The mosquitoes only became infected in one of the thus animals on the 2nd day after inoculation, when its serum had a viral load of 1.3×10^4 PFU/mL. Infected mosquitoes exhibited low infection rate and no dissemination up to 14 dpi. Finally mosquitoes were challenged orally through artificial feeder with higher viral titers (10^6 , 10^7 and 10^8 PFU/ mL). *Ae. aegypti* showed low infection rate (15%) when challenged with a titer of 10^6 PFU/mL, but higher infection rate when challenged with high titers: 10^7 (70%) and 10^8 (100%). The results indicate that the oral infection of *Ae. aegypti* is significantly dose dependent and that the prevention and control of vector transmission of ZIKV in Brazil should focus on efforts against this mosquito, the only one confirmed until now as a natural vector with high experimental competence.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Arbovírus Emergentes	1
1.2 Vírus Zika.....	4
1.2.1 Histórico e Emergência.....	4
1.3. Mosquitos Vetores do ZIKV	10
1.4. Transmissão não-vetorial do ZIKV.....	12
1.5. Manifestações Clínicas das Infecções por ZIKV.....	13
1.6. Ciclo do vírus no mosquito.....	14
1.7. Resposta Imune do Vetor	15
1.8. Capacidade Vetorial.....	16
1.9. Competência Vetorial.....	17
1.10. O vetor <i>Aedes aegypti</i>	20
1.11. <i>Culex quinquefasciatus</i>	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivo Específico	25
3 RESULTADOS	26
3.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> from Rio de Janeiro is not Competent to Transmit the Local Zika Virus.....	26
3.2 <i>Culex quinquefasciatus</i> from areas reporting the highest incidence of microcephaly associated to Zika virus infections, Northeastern Brazil, are refractory to the virus	41
3.3 Susceptibilidade de <i>Aedes aegypti</i> desafiados com diferentes diluições do vírus Zika isolado no Espírito Santo, ES.....	52
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÕES	74
6 PERSPECTIVAS	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8 APÊNDICE	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global de arbovírus emergentes e re-emergentes	2
Figura 2. Distribuição global estimada de dengue, chikungunya e zika.....	3
Figura 3. Organização da partícula e genoma do ZIKV	5
Figura 4. Análise filogenética do ZIKV incluindo cepas recém-emergentes.	6
Figura 5. Ciclos de transmissão do ZIKV na África.....	7
Figura 6. Série cronológica e cartografia de casos de zika registrados no Brasil em 2015.....	9
Figura 7. Distribuição geográfica dos principais vetores do ZIKV	11
Figura 8. Formas de transmissão reportadas para o ZIKV	13
Figura 9. Infecção de um mosquito vetor por arbovírus.....	19
Figura 10. Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 11. Principais diferenças entre <i>Aedes aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i>	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

CEUA - Comitê de Ética para o Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz

ECSA - Genótipo de Chikungunya do Leste-Central-Sul-Africano.

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês “*Center for Disease Control and Prevention*”

CHIK - Vírus Chikungunya

CV – Capacidade Vetorial

DENV – Vírus Dengue

DIR – Taxa de disseminação, do inglês “*Dissemination Rate*”

ECDC – Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês “*European Centre for Disease Prevention and Control*”

GxG - Interação entre genótipos

GxGxT - Interação ente genótipos do vírus, vetor e temperatura ambiental

IR – Taxa de infecção, do inglês “*Infection Rate*”

MIB – Barreira de infecção do intestino, do inglês “*Midgut infection barrier*”

MEB – Barreira de escape do intestino, do inglês “*Midgut escape barrier*”

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

ORF – Fase aberta de leitura

RT-PCR – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SGEB - Barreira de escape da glândula salivar, do inglês “*Salivary gland escape barrier*”

SGB - Síndrome de Guillain-Barré

SGIB – Barreira de infecção da glândula salivar, do inglês “*Salivary gland infection Barrier*”

TR – Taxa de transmissão, do inglês “*Transmission Rate*”

TE – Taxa de eficiência

YFV – Vírus da Febre Amarela, do inglês “*Yellow fever virus*”

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

ZIKV – Vírus Zika

INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus emergentes

A palavra arbovírus vem do termo em inglês *arthropod-borne virus*, introduzido em 1942 e utilizado para descrever os vírus que necessitam de um artrópode para completar seu ciclo e ser transmitido para um hospedeiro vertebrado (WHO, 1985).

Todos arbovírus conhecidos são parasitas naturais de animais - patógenos zoonóticos (Gubler e Vasilakis, 2016) e incluem diversos grupos de vírus pertencentes a diferentes famílias virais, incluindo: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae* (Karabatsos, 1985; CDC, 2016).

Os arbovírus abrangem grupos de vírus RNA e tem uma considerável variedade de genomas e estratégias de replicação, sugerindo que a transmissão a vertebrados via artrópodes surgiu há muito tempo, durante processo de evolução destes vírus (Weaver e Resen, 2010).

No Catálogo Internacional de Arbovírus e outros vírus estão registrados 534 vírus, sendo 135 deles causadores de doenças em humanos (Gubler, 2016). Entretanto, com o avanço de tecnologias voltadas pela detecção e caracterização viral, como o sequenciamento genômico, a identificação de novos agentes se torna cada vez mais frequente (Gubler, 2016).

Grande parte dos arbovírus utilizam mosquitos e carrapatos como hospedeiros invertebrados. *Aedes* e *Culex* são os gêneros de mosquitos mais associados à transmissão de arbovírus (Karabatsos, 1985). Maruins (Ceratopogonídeos), piolhos (Anopluros), flebotomíneos (Psychodídeos), borrachudos (Simuliídeos), percevejos (Cimicídeos) e ácaros também podem transmitir diferentes arbovírus (Adelmar, 2013).

A grande diversidade de espécies de vetores e a ampla distribuição geográfica e espacial dos mesmos podem explicar o sucesso de determinados arbovírus em se disseminar globalmente (Weaver e Reisen, 2010; King, 2012).

A maioria dos arbovírus está distribuída em regiões tropicais e subtropicais (Gubler, 2002; Anez et al., 2012). Porém, arbovírus que infectam humanos e causam epidemias em ambientes urbanos e suburbanos tem dispersado intensamente dentro e dentre essas regiões, mas também para regiões de clima temperado (Figura 1).

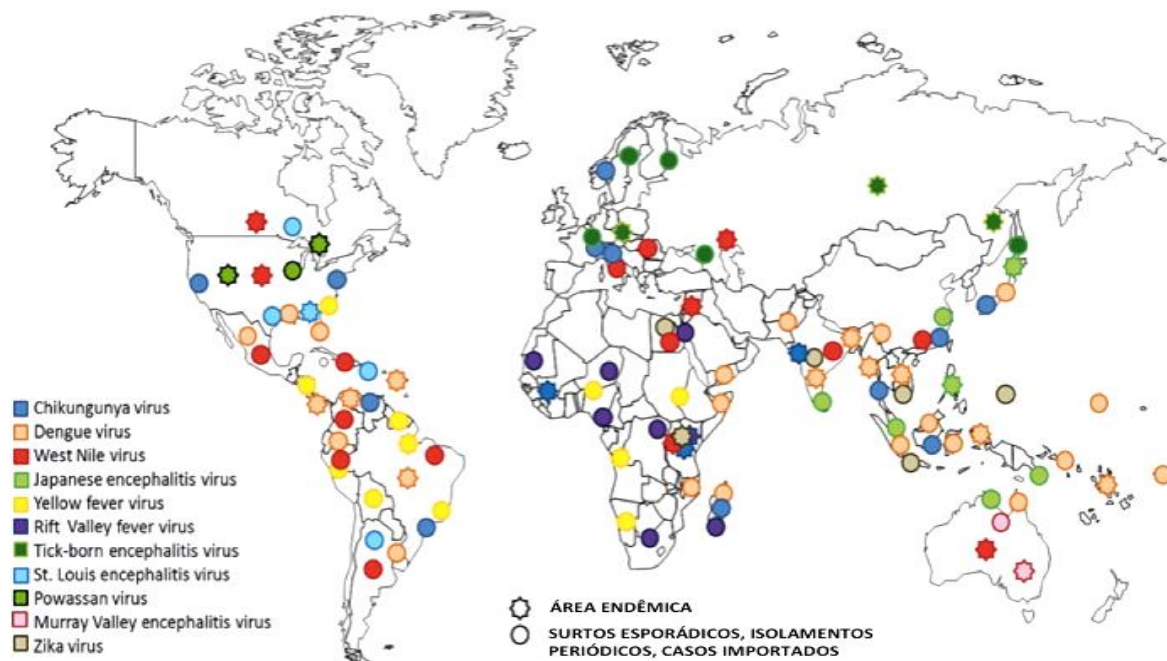


Figura 1: Distribuição global de arbovírus emergentes e re-emergentes (Adaptado de Anez et al 2012).

Uma complexa interação pode explicar a emergência e surtos de doenças virais, que envolve os vírus (adaptação a novos hospedeiros), alterações climáticas, migração de animais, processo de urbanização e atividades humanas, como agricultura e até mesmo guerras (Gubler, 2001; Gubler, 2002; Weaver e Reisen 2010; Hall *et al.*, 2016).

Um dos primeiros arbovírus isolados foi o vírus febre amarela (YFV) em 1927, seguido do vírus da encefalite St. Louis (SLEV), em 1933, vírus do oeste do Nilo (WNV), em 1937, chikungunya (CHIKV), em 1938 e dengue (DENV), em 1943 e zika (ZIKV) em 1947 (Karabastos, 1985).

A Fundação Rockefeller, fundada em 1914, contribuiu para a descoberta de um grande número de arbovírus entre 1935 e 1970. O estabelecimento desta instituição em países da África e América do Sul resultou na identificação de muitos arbovírus nestas regiões (Gubler e Vasilakis, 2016). Apesar da redução nos investimentos na década de 70, e conseqüentemente menor descoberta de novos vírus (Gubler 2001), um aumento na incidência de epidemias causadas por arbovírus previamente descritos e novos arbovírus, foi reportada nos últimos 30 anos. A maioria dos arbovírus emergentes pertencem aos gêneros *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae* (Gubler e Vasilakis 2016).

Mais recentemente, os arbovírus que causam dengue, chikungunya e zika rapidamente se dispersaram no mundo, ocasionando epidemias de grandes proporções em territórios do Novo Mundo (Patterson *et al.*, 2016), Figura 2.

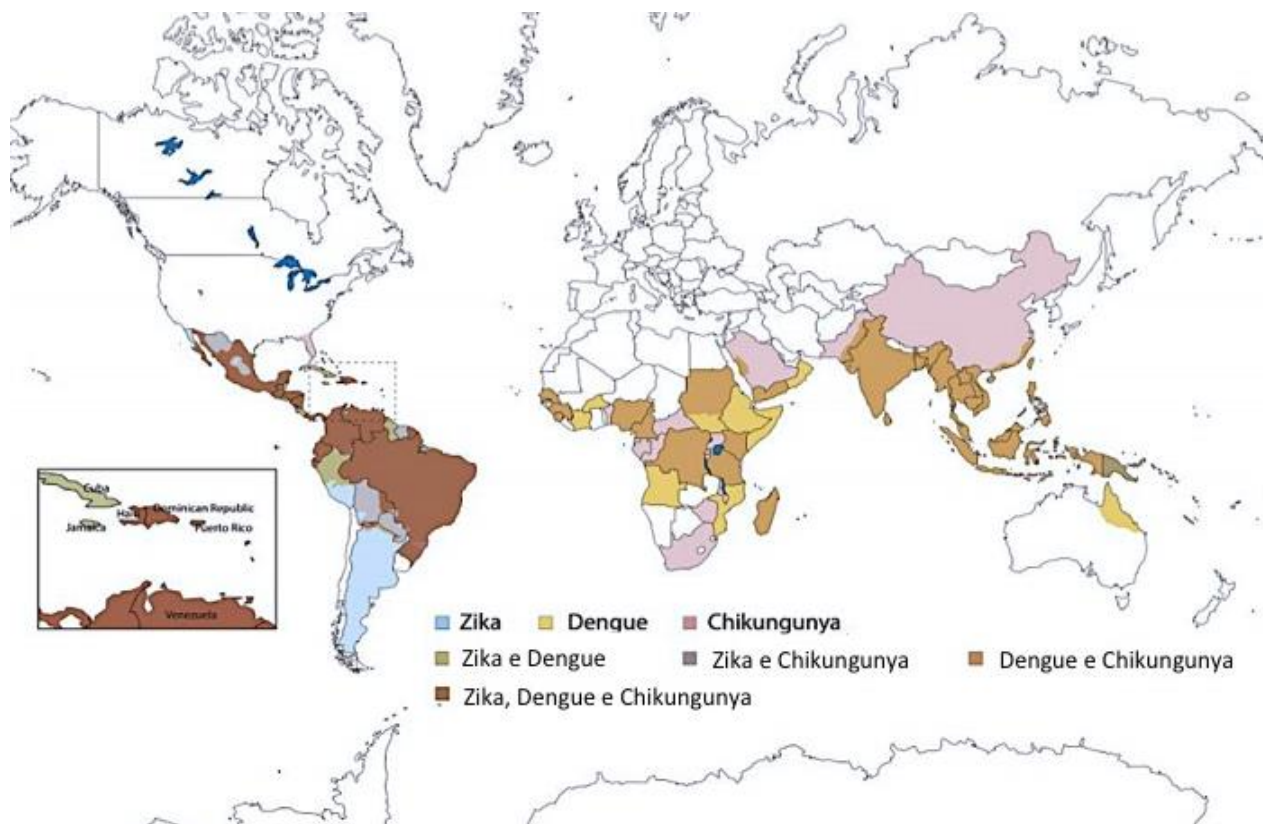


Figura 2: Distribuição global estimada de dengue, chikungunya e zika (Adaptada de Patterson *et al.*, 2016).

Epidemias por arbovírus transmitidas por *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), inclusive devido à introdução de casos importados, têm sido relatadas no Brasil desde o século XIX. O YFV introduzido provavelmente do Oeste da África juntamente com o vetor urbano *Ae. aegypti*, causou grande epidemias nas cidades brasileiras desde o século XVIII (Franco, 1969). Em 1848, por exemplo, o vírus amarelo, já endêmico na cidade, causou uma epidemia na cidade do Rio de Janeiro, após a chegada de marinheiros em navios norte-americanos (Franco, 1969).

Na década de 1920, o DENV causou surtos no Rio de Janeiro e na cidade de Niterói, no entanto, através de programas de controle da febre amarela, tanto a dengue quanto a febre amarela, foram consideradas erradicadas no país (Magalhães, 2016).

O YFV por ter estabelecido, nas Américas, um ciclo de transmissão zoonótico e silvestre, independente de humanos como vertebrado amplificador e do mosquito *Ae. aegypti* como vetor, foi erradicado do país, como consequência do programa

continental de erradicação deste mosquito orquestrada pela OPAS (Magalhães, 2016). Conseqüentemente, o YFV vem causando ondas epidêmicas cíclicas devido às infecções humanas adquiridas acidentalmente no ambiente silvestre ou rural, sendo, portanto, limitadas em número de casos e abrangência. Porém, uma série de vírus potencialmente epidêmicos foram reintroduzidos ou introduzidos no Brasil, desde o início da década de 1980 (Figueiredo, 2010). Tratam-se de vírus que, embora originalmente zoonóticos e silvestres especialmente no continente Africano, co-evoluíram e se adaptaram ao vetor antropofílico e urbano *Ae. aegypti*, e passaram a ter humanos como hospedeiro amplificador, características que favorecem a geração de epidemias (Figueiredo, 2010).

Os quatro sorotipos de DENV (DENV 1-4) foram introduzidos no Brasil entre 1980 e 2011 (Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1993; Nogueira *et al.*, 2002; Temporão *et al.*, 2011) causando extensas epidemias nas últimas três décadas. O DENV é considerado o causador da doença viral transmitida por vetores com a propagação mais rápida (WHO, 2012) e, nos últimos 50 anos, afetou mais de 100 países em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Akiner *et al.*, 2016).

Os primeiros casos autóctones de CHIKV foram notificados em setembro de 2014 no município de Oiapoque (AP) e, posteriormente, em Feira de Santana (BA), este último, pelo genótipo africano (ECSA) do vírus provavelmente introduzido a partir de Angola (Figueiredo e Figueiredo, 2014; Nunes *et al.*, 2015)

.No Brasil em 2014 foram confirmados os primeiros casos autóctones de zika no Nordeste (Campos, 2015; Zanluca *et al.*, 2015).

1.2 Vírus Zika

1.2.1 Histórico e emergência

O ZIKV (Família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*), é um vírus esférico, envelopado com genoma constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases (kb) de comprimento. O genoma codifica três proteínas estruturais, a do nucleocapsídeo (C), e duas inseridas no envelope viral, a proteína da membrana (M) e a proteína do envelope (E), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Kuno e Chnag, 2007; Lindenbach *et al.*, 2013), (Figura 3).

As estruturas da partícula madura de vários flavivírus, incluindo do ZIKV possuem, de uma forma geral, uma arquitetura semelhante (Sirohi *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2017). No entanto, análises da proteína viral do envelope do ZIKV demonstra partes semelhantes aos vírus neurovirulentos WNV e vírus da encefalite japonesa (JEV), enquanto outras partes semelhantes aos DENV (Kostyuchenko *et al.*, 2016).

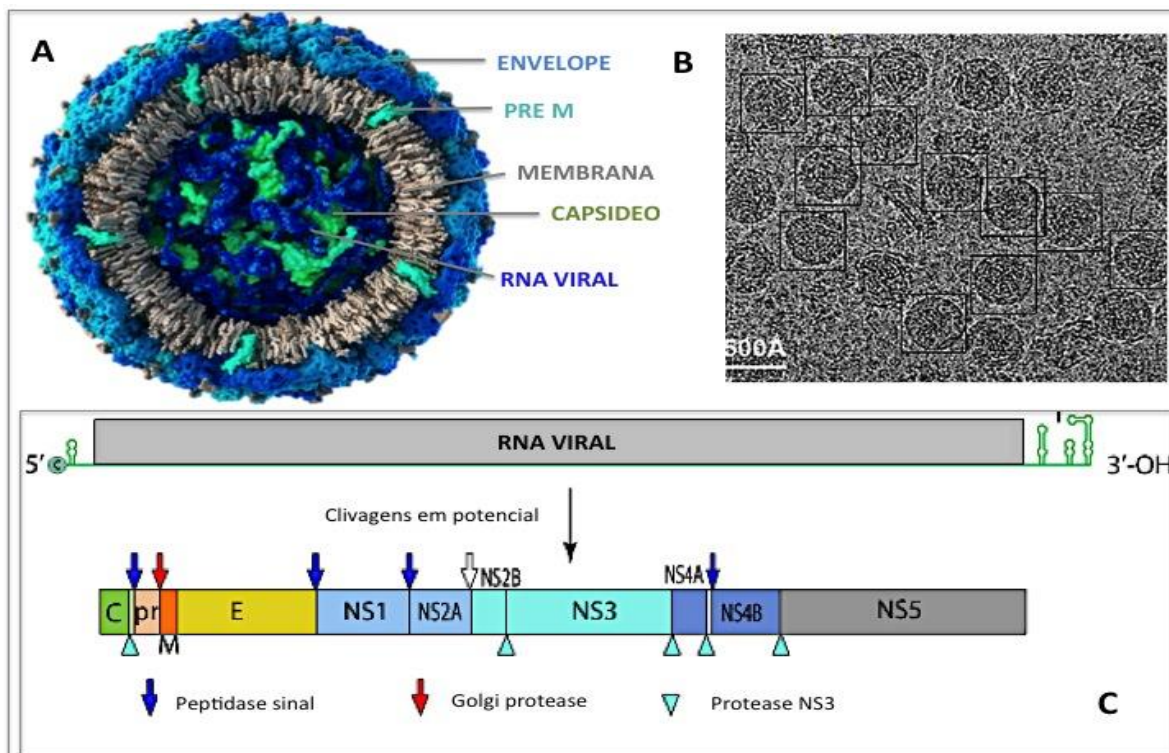


Figura 3: Organização da partícula e genoma do ZIKV. (A) Esquema representativo da partícula, (B) Crio eletro microscopia da partícula viral e (C) esquema representativo do genoma viral. C: capsídeo, prM: precursor de Membrana, E: envelope, NS (Não estrutural). Adaptado de Sirohi *et al.*, 2016; Kostyuchenko *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2017).

O RNA do ZIKV está presente em altos títulos no sangue humano apenas entre os primeiros 3-5 dias após o início dos sintomas (Balm *et al.*, 2012), enquanto é detectado na urina por mais de 10 dias (Gourinat *et al.*, 2015) e no sêmen por diversas semanas (Foy *et al.*, 2011; Zammarchi *et al.*, 2015; Musso *et al.*, 2015; Atkinson *et al.*, 2016, Mansuy *et al.*, 2016). Um estudo descreve uma persistência do vírus em sêmen por mais de 2 meses (Atkinson *et al.*, 2016) e carga viral 100.000 vezes maior do que no sangue e urina (Mansuy *et al.*, 2016). O genoma viral também foi identificado em swab nasofaríngeo (Zammarchi *et al.*, 2015).

Estudos filogenéticos descrevem a existência de dois genótipos de ZIKV: Africano e Asiático (Musso e Gubler *et al.*, 2016). Estima-se que o vírus tenha originado no Leste da África e dispersado para o Oeste africano e Ásia há aproximadamente 50-100 anos (Faye *et al.*, 2014).

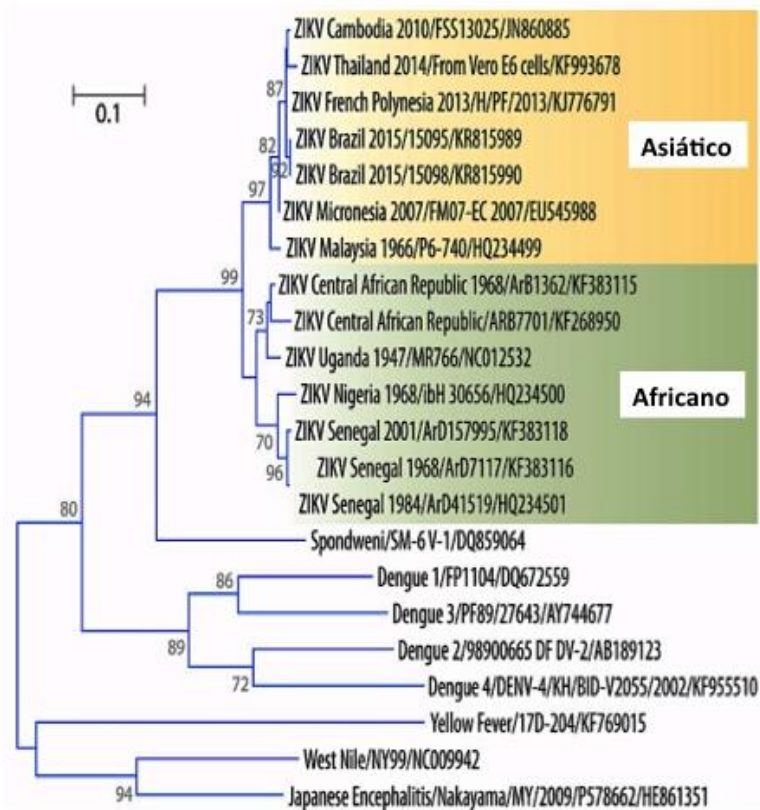


Figura 4: Análise filogenética do ZIKV incluindo estirpes emergentes. Adaptado de Musso e Gubler, 2016.

O ZIKV foi isolado pela primeira vez na África, em 1947, a partir do sangue de macacos rhesus sentinelas na Floresta de Zika, em Uganda, quando visava-se conhecer a dinâmica da febre amarela silvestre. Em 1948, o mosquito *Aedes (Stegomyia) africanus* foi caracterizado como vetor transmissor do ZIKV, a partir da análise de macerados de mosquitos inoculados em camundongos, que desenvolveram a infecção viral (Dick, Kitchen e Haddow, 1952; Haddow *et al.*, 1964; Brès, 1970).

A transmissão do ZIKV tem sido documentada em dois ciclos ecologicamente e evolutivamente distintos: um enzootico, silvestre, onde o vírus circula entre espécies arbóreas de mosquitos *Aedes* e primatas não-humanos e um ciclo urbano, entre o

homem e espécies domésticas/peri-domésticas de *Aedes* (Vasilakis e Weaver, 2017), (Figura 5).

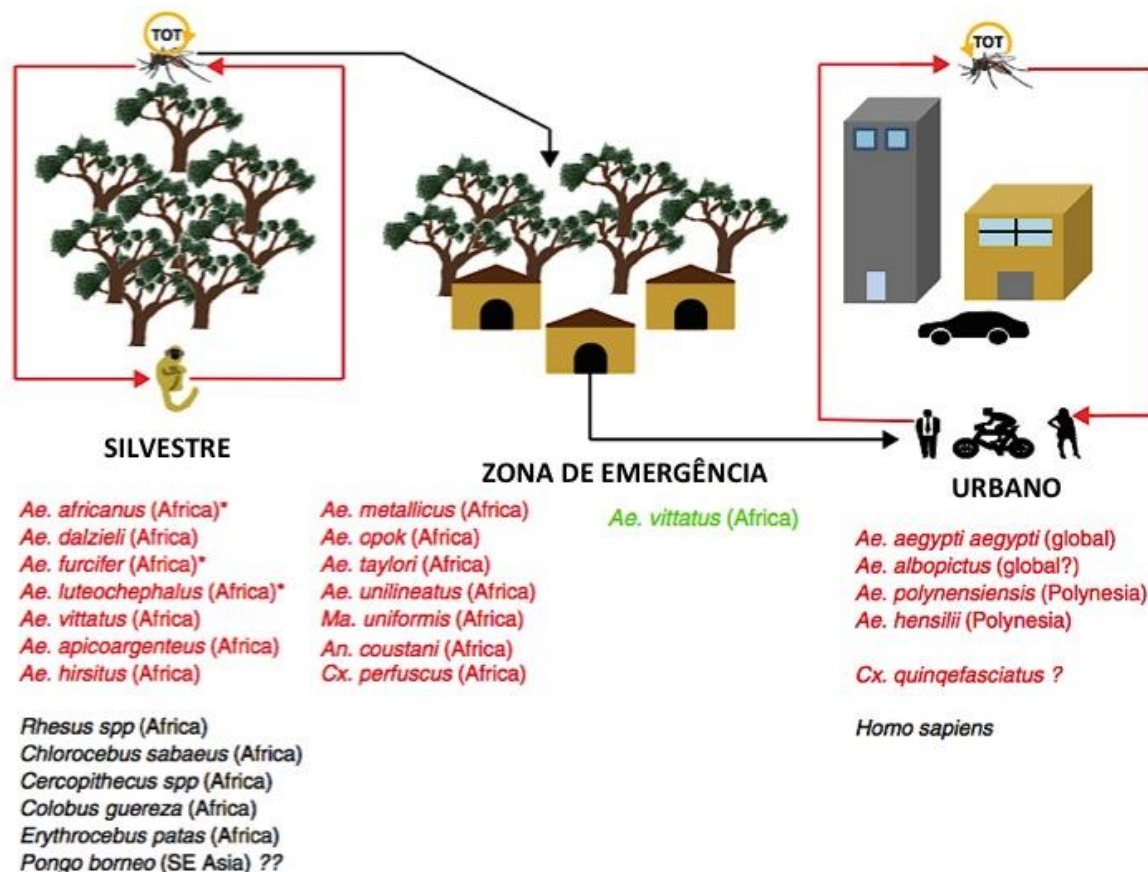


Figura 5: Ciclos de transmissão do ZIKV na África com vetores potenciais e hospedeiros de amplificação/reservatório de vertebrados e supostos padrões de emergência para o ciclo urbano humano-mosquito-humano. Adaptado de Vasilakis e Weaver, 2017.

O primeiro isolado de ZIKV de humanos foi obtido a partir de um caso febril em uma nigeriana de 10 anos, em 1954; na ocasião, outros casos da doença foram confirmados por dosagem de anticorpos neutralizantes (Macnamara, 1954). Fora da África, o ZIKV foi isolado pela primeira vez a partir de mosquito *Ae. aegypti*, em 1969, na Malásia (Marchette, Garcia e Rudnick, 1969), e a primeira infecção em humanos, foi documentada na Indonésia em 1977 (Olson *et al.*, 1981). Embora, nesta época, tenha sido sugerida uma ampla disseminação de ZIKV na África e Ásia, o número de casos confirmados é incerto, diante dos métodos de diagnósticos utilizados que apresentavam reação cruzada com outros *Flavivirus* co-circulantes (Kokernot, 1965). No entanto, existem evidências de que o ZIKV seja endêmico na África (Leste, Central, Oeste e Sul) e em alguns países da Ásia (Musso e Gubler, 2016), considerando isolamentos ocasionais do vírus ao longo dos anos.

Em 2007, ocorreu o primeiro e significativo surto de ZIKV, em Libreville, no Gabão, quando soro de 4312 pacientes com sintomas de zika e 4665 mosquitos foram analisados e positivos para o ZIKV (Grard *et al.*, 2014). No mesmo ano, na ilha de Yap, na Micronésia, houve um surto de uma doença exantemática semelhante à dengue, no entanto, com relato de febre baixa e conjuntivite. Foi estimado que 72.6% dos residentes da Ilha, acima de três anos de idade tenham sido infectados por ZIKV (Duffy *et al.*, 2009).

No final de 2013, ocorreu um surto de doença febril semelhante a dengue na Polinésia Francesa, quando foram estimados 19 mil casos suspeitos (Cao-Lormeau *et al.*, 2014). Todos os arquipélagos da Polinésia Francesa foram subsequentemente afetados e, no fim do surto, em 2014, 30.000 casos de Zika foram estimados (Musso *et al.*, 2014; Mallet *et al.*, 2015).

Análises filogenéticas a partir de sequências de ZIKV coletadas no Pacífico demonstraram que o isolado da Polinésia Francesa era próxima das cepas do Camboja, de casos registrados em 2010, e de Yap em 2007, corroborando com hipótese de emergência e expansão de uma linhagem Asiática do ZIKV (Cao-Lormeau *et al.*, 2014).

Em novembro de 2013, três casos de Zika foram reportados na Nova Caledônia, em pacientes que retornaram da Polinésia Francesa e, em meados de janeiro de 2014, foi registrado o primeiro autóctone de ZIKV (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015).

O surto de Zika na Nova Caledônia foi declarado em fevereiro de 2014, e no final de agosto foram registrados 1.400 casos da doença, incluindo 35 casos importados, sendo novamente confirmada a origem asiática do vírus (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015, Gourinat *et al.*, 2015).

No Brasil, os primeiros casos autóctones de zika ocorreram em pacientes com quadro de febre baixa, exantema e artralgia em Camaçari, na Bahia (Campos *et al.*, 2015) e em Natal, Rio Grande do Norte (Zanluca *et al.*, 2015). Foi a primeira vez em que se confirmou a circulação nas Américas.

Em 2015, a doença já havia atingido as cinco regiões do Brasil, estendendo-se a outros países do continente Americano e, até julho, 2.791 casos suspeitos de zika haviam sido detectados (Faria *et al.*, 2016) (Figura 6). No entanto, as informações disponíveis sobre o número de casos naquele ano são incertas, pois a doença passou a ser de notificação compulsória somente com a publicação da Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016 (Brasil, 2016a).

Em 2016, foram registrados 215.319 casos prováveis de zika no Brasil (taxa de incidência de 105,3 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.306 municípios, tendo sido confirmados 130.701 (60,7%) casos laboratorialmente. A região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência, com 222,0 casos/100 mil habitantes, seguida da região Nordeste com 134,4 casos/100 mil habitantes (Brasil, 2016b).

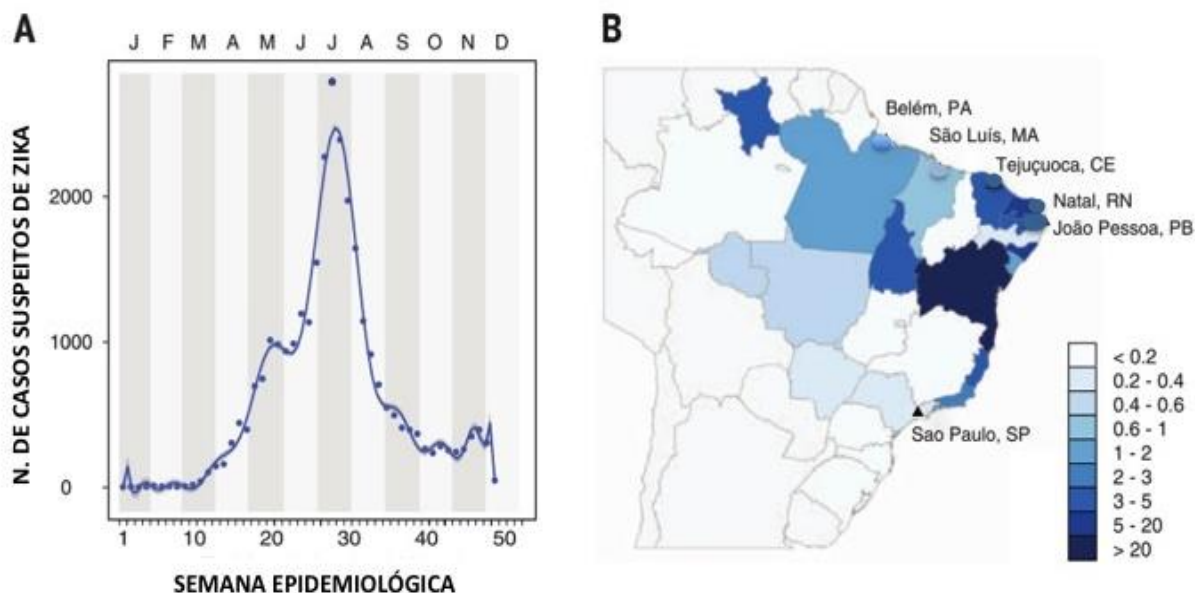


Figura 6: Série cronológica e cartografia de casos de zika registrados no Brasil em 2015. (A) Número de casos suspeitos de ZIKV por semana em 5.570 municípios no país. As letras indicam os meses. (B) Incidência total de casos de ZIKV por 100.000 pessoas em cada unidade federativa. Adaptado de Faria *et al.*, 2016.

Existem controvérsias com relação à entrada do ZIKV no Brasil. Algumas hipóteses sugerem que sua introdução teria ocorrido durante a Copa do Mundo de Futebol que ocorreu entre junho e julho de 2014 (Zanluca *et al.*, 2014). Uma segunda hipótese seria por um campeonato de Canoagem que ocorreu em agosto de 2014, no Rio de Janeiro, com a presença de atletas da Polinésia Francesa, Nova Caledônia e Ilhas Cook, que poderiam ter introduzido o vírus no país, uma vez que estas ilhas do Pacífico haviam sido atingidas por epidemias recentes e causadas pela mesma linhagem Asiática do ZIKV (Musso, 2015). Entretanto, através de um estudo filogenético, Faria *et al* (2016) sugerem que a entrada de ZIKV ocorreu entre os meses de maio de dezembro de 2013, antes dos eventos esportivos ocorridos.

1.3 Mosquitos vetores do Vírus Zika

O primeiro vetor reconhecido na transmissão do ZIKV foi o *Aedes africanus*, em 1948, na Uganda, África (Dick *et al.*, 1952). Trata-se de uma espécie silvestre, também envolvida na transmissão da febre amarela, com tendência a picar ao nível da copa da floresta, mas que pode picar primatas humanos e não humanos junto ao solo, dentro ou fora das matas (Haddow *et al.*, 1964).

Em 1966, na Malásia, o ZIKV foi isolado de *Ae. aegypti*, sendo a primeira vez que este vetor foi encontrado infectado com vírus (Marchette *et al.*, 1969).

Ambos mosquitos, *Ae. africanus* e *Ae. aegypti*, são espécies próximas, pertencentes ao mesmo subgênero de mosquitos do Velho Mundo, o subgênero *Stegomyia*. Porém, enquanto a primeira se confirma como vetor silvestre e rural, que geral casos geralmente isolados ou surtos de pequena grandeza, a segunda se apresenta como vetora no ciclo de transmissão urbano e epidêmico.

Uma vez que a circulação de ZIKV ocorreu com baixa incidência no mundo durante muito anos, a investigação sobre seus vetores não teve avanços por décadas, seja em experimentação laboratorial seja na busca de infecção natural.

Mais recentemente, o ZIKV foi isolado de um macho de *Ae. (Diceromyia) furcifer*, coletado em ambiente próximo às aldeias, sugerindo possível transmissão vertical, que poderia ser um importante mecanismo de manutenção do ZIKV na natureza (Diallo *et al.* 2014). Outras espécies, como os *Ae. dalzieli*, *Ae. furcifer*, *Anopheles africanus*, *Na. coustani*, *Na. gambiae*, *Cx. perfuscus* e *Mansonia uniformis* também foram sugeridos como potenciais vetores do ZIKV em coletas realizadas no Senegal, África Ocidental entre 1962 a 2008 (Diallo *et al.*, 2014).

O *Ae. albopictus* é outra espécie de importância para a transmissão do ZIKV. A espécie foi encontrada em Camarões, na África Central e Moçambique no Sudeste da África, substituindo gradualmente o *Ae. aegypti*, e apresentou uma expansão dinâmica em países de climas temperados em todo o globo (Ngoagouni *et al.*, 2015).

No Pacífico, os vetores de ZIKV são mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o mais prevalente, *A. aegypti*, seguido de *A. albopictus*, ambos também são conhecidos por transmitir o CHIKV e DENV (Calvez *et al.*, 2016). Ambas as espécies são consideradas competentes vetores da linhagem asiática ZIKV, e sua prevalência aumentou de 2011 à 2014 (Roth *et al.*, 2014) (Figura 8).

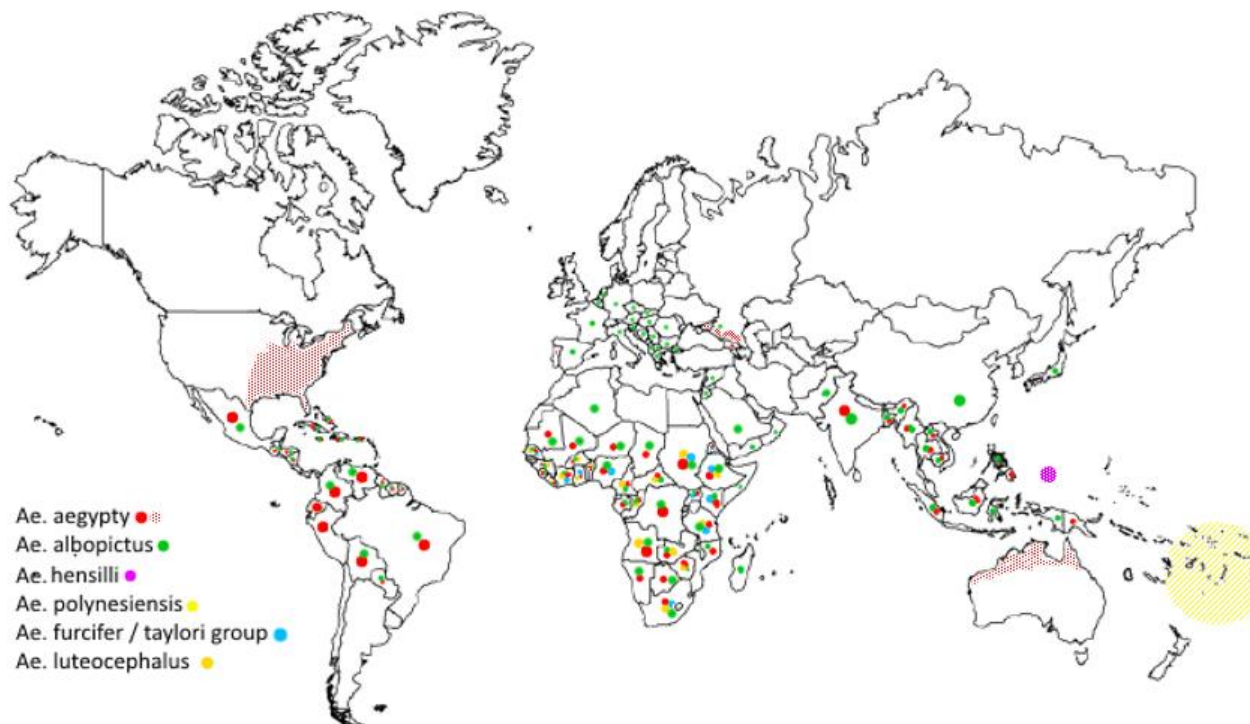


Figura 7: Distribuição geográfica dos principais vetores do ZIKV. Adaptado de Aguilar-Cabezas, 2016.

Nas Américas, o *Ae. aegypti* é uma espécie de particular interesse na transmissão de arbovírus, dentre eles, os quatro sorotipos de DENV (Lourenço-de-Oliveira et al, 2002, Salazar et al, 2007, Dick et al, 2012, Sylvestre et al, 2013, Carrington et al, 2014) e CHIKV (Vega-Rúa et al, 2015, Figueiredo e Figueiredo 2014), além de ser vetor do ciclo urbano da febre amarela, não registrado no Brasil desde 1942 (Magalhães, 2016).

Em vista dos resultados de investigações entomológicas do passado, na África e Ásia, e devido ao elevado grau de antropofilia na América tropical, o *Ae. aegypti* foi considerado como vetor potencial do ZIKV no Novo Mundo (Fernandes et al., 2016; Chouin-Carneiro et al., 2016; Weger-Lucarelli et al., 2016; Hart et al., 2017).

Recentemente, foi demonstrado que *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, da Guiana, do Caribe e dos EUA foram capazes de se infectar e disseminar o ZIKV eficientemente, diferente do observado para populações de *Ae. albopictus* (Chouin-Carneiro et al., 2016). Além disso, populações de *Ae. aegypti* foram encontradas naturalmente infectadas no México e Brasil. (Guerbois et al., 2016, Ferreira-de-Brito et al., 2016). No entanto, a rápida dispersão do ZIKV no continente americano e a elevada incidência de infecção pelo vírus em áreas onde *Ae. aegypti* e, principalmente *Ae. albopictus*, tinham frequência relativamente baixa, poderiam sugerir a participação de outras espécies na transmissão viral.

De fato, outro grupo de espécies mosquito muito antropofílicas como o *Ae. aegypti*, e que é amplamente distribuído, são espécies do gênero *Culex* incluídas no Complexo *Pipiens*. Neste contexto, a avaliação da competência vetorial de *Cx. quinquefasciatus*, a espécie mais prevalente no território brasileiro e de outros países tropicais é de grande relevância e pertinência.

1.4. Transmissão não vetorial do ZIKV

Apesar do principal modo de transmissão do ZIKV ser preferencialmente vetorial, relatos de transmissão ocupacional, perinatal e sexual do vírus já foram reportadas (Foy *et al.*, 2011; Musso *et al.*, 2014; Zammarchi *et al.*, 2015; Patino-Barbosa, 2015; Hennessey *et al.* 2015) (Figura 7).

A transmissão sexual do ZIKV está sendo documentada (Foy *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2016; Venturi *et al.*, 2014; Mansuy *et al.*, 2016; Hills *et al.*, 2016; Atikson *et al.*, 2016; D'Ortenzio *et al.*, 2016) e partículas infecciosas no sêmen já foram recuperadas (Musso *et al.*, 2015; Mansuy *et al.*, 2016). Apesar da confirmação da transmissão sexual do ZIKV para uma paciente do sexo feminino, o vírus não foi detectado na secreção vaginal (D'Ortenzio *et al.*, 2016).

Não há nenhuma evidência relatada de transmissão através da amamentação, embora RNA do ZIKV tenha sido encontrado no leite materno (Besnard *et al.*, 2014). No entanto, ainda não está claro se essas partículas são capazes de transmitir o vírus e gerar infecção.

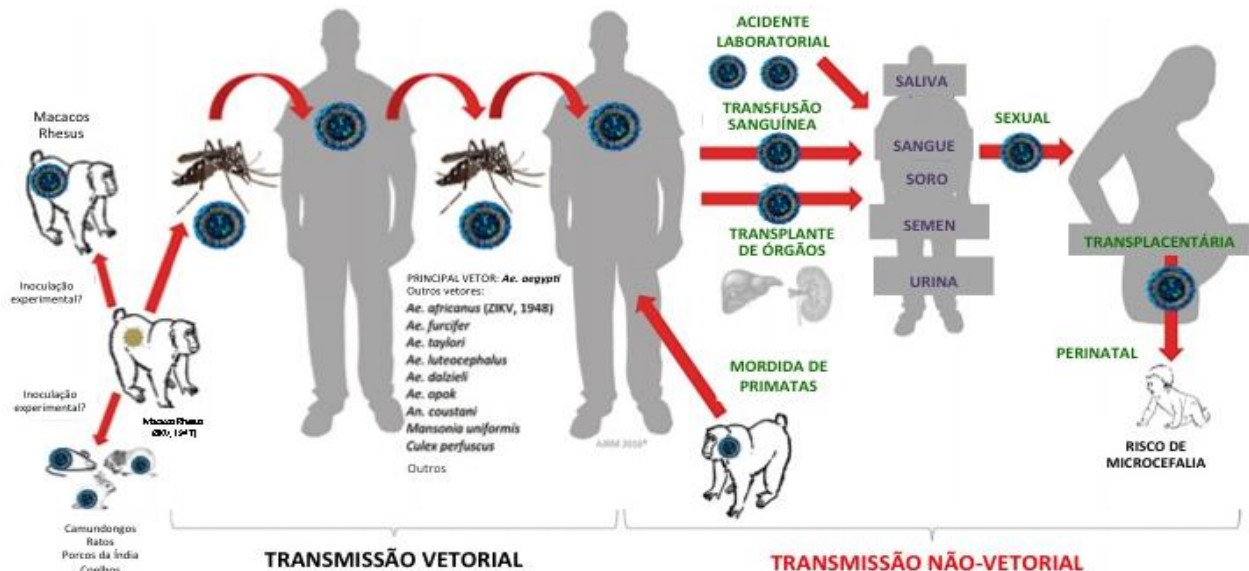


Figura 8: Formas de transmissão reportadas para o ZIKV (Adaptado de Rodriguez-Morales et al., 2016).

1.5 Manifestações clínicas das infecções por ZIKV

A zika é uma doença febril aguda e autolimitada e estima-se que somente 18% das infecções resultem em manifestações clínicas, sendo, portanto, mais frequente a infecção assintomática (Duffy et al., 2009; Loos et al., 2014).

Quando sintomática, causa febre baixa, exantema maculopapular, artralgia, mialgia, cefaleia, hiperemia conjuntival e, menos frequentemente, edema, odinofagia, tosse seca e alterações gastrointestinais, principalmente vômitos (CDC, 2016). Em geral, o desaparecimento dos sintomas ocorre entre 3 e 7 dias após seu início. Normalmente, não é associada a complicações graves, registro de óbitos e ocasiona uma baixa taxa de hospitalização (Balm et al., 2012).

No entanto, relatos de casos da síndrome de Guillain-Barré (SGB) em infecções por ZIKV, principalmente em regiões de co-circulação com os DENV foram descritos (Oehler et al., 2015; Musso e Gubler, 2016).

A SGB é uma condição neurológica de provável origem autoimune, em que aproximadamente 60% dos casos podem ser atribuídos a quadros infecciosos recentes (Hugh et al., 2016).

Na Polinésia Francesa, durante o surto de zika em 2013 e 2014, foram reportados 42 casos de SGB (Cao-Lormeau et al., 2014). No Brasil, registrou-se em

2015, um incremento de 66% nas internações por SGB em comparação com a média do mesmo período, nos anos de 2008 a 2014 (Malta *et al.*, 2017).

A microcefalia congênita é uma condição neurológica definida pela circunferência cefálica frontal-occipital menor que o esperado para a idade gestacional e gênero (Araújo *et al.* 2016). As evidências científicas existentes até o momento indicam que ZIKV está relacionado à ocorrência de microcefalia (CDC, 2016; PAHO 2015; Calvet *et al.*, 2016; Oliveira Melo, 2016; Musso e Baud, 2016).

Entre novembro de 2015 até o mês de dezembro de 2016, um total de 2.366 casos de microcefalia e/ou alterações no sistema nervoso central foram confirmados no Brasil, sendo 1,804 casos na região Nordeste, 298 do Sudeste, 145 do Centro-Oeste, 92 do Norte e 27 do Sul (Brasil, 2017b).

1.6 Ciclo do vírus no mosquito

O tempo decorrido entre o repasto infectante até o mosquito estar capacitado para a transmissão do vírus, ou seja, presença de partículas virais infectantes na saliva, é denominado como período de incubação extrínseco (PIE), que depende tanto de fatores ambientais, como temperatura e umidade, bem como de fatores intrínsecos como, competência vetorial, carga viral dos hospedeiros vertebrados (Black *et al.*, 2002).

Durante esse período, o vírus poderá ou não replicar em diferentes tecidos do inseto e interagir com diversas moléculas, como as envolvidas na resposta imune. Após a ingestão de sangue infectado, as partículas virais aderem à membrana plasmática das células epiteliais do intestino médio do mosquito estabelecendo infecção seguida de replicação viral (Lourenço-de-Oliveira, 2015).

Uma vez que o vírus consegue deixar o intestino, ele passa para a hemocele podendo infectar órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso. Então estabelece-se a infecção e replicação na glândula salivar. Para que este mosquito seja considerado apto a transmitir o vírus, partículas virais precisam ser eliminadas juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (Hardy *et al.*, 1980; Woodring *et al.*, 1996; Black IV *et al.*, 2002, Lourenço-de-Oliveira 2015).

O período de incubação extrínseco pode variar dependendo do vírus, das populações de mosquitos e das condições ambientais de incubação. No caso dos

DENV, Salazar *et al* (2007) observaram significativas taxas de transmissão (26 a 50%) em mosquitos *Ae. aegypti* 7 dias pós-exposição à cepa de DENV-2 isolada na Jamaica.

Em comparação com DENV, o CHIKV é um vírus que se dissemina rapidamente em seus hospedeiros invertebrados, ou seja, cerca de dois dias pós-infecção, já são detectados na saliva dos mosquitos (Vega-Rúa *et al.*, 2014).

Até o momento, poucos estudos foram realizados acerca de PIE do ZIKV. Chouin-Carneiro *et al.*, (2016) descreveu a transmissão em mosquitos *Ae. albopictus* somente com 14 dias de infecção para isolado de Zika da Nova Caledônia, no entanto, Weger-Lucarelli *et al.* (2016) observou em mosquitos *Ae. aegypti*, transmissão de isolados africanos de Zika (Senegal e Uganda) a partir dia 7 após a infecção.

1.7 Resposta imune do vetor

A imunidade inata em artrópodes desempenha um papel importante para limitar a infecção por patógenos. Em termos gerais, a defesa contra agentes patogênicos por mosquitos é realizada por três mecanismos: fagocitose mediada por células, melanização e lise (Hillyer, 2010). Cada um é iniciado por receptores de reconhecimento de padrões e os fatores que levam à morte podem ser subdivididos em celular e humoral. A resposta celular inclui fagocitose, agregação de hemócitos e encapsulação dos patógenos (Hernández-Martínez *et al.*, 2002; Hillyer, Schmidt, Christensen, 2003; Castillo, Robertson e Strand, 2006). A resposta humoral inclui receptores de reconhecimento de padrões, peptídeos antimicrobianos, sistema de cascata de profenoloxidase, melanização e cicatrização (Lowenberger, 2001; Christensen *et al.*, 2005; Dong e Dimopoulos, 2009). Independentemente dessa organização conceitual, os limites entre a imunidade celular e a humoral são de difícil demarcação porque muitos componentes humorais são produzidos por hemócitos e participam em respostas imunes celulares (Hillyer, 2010).

As barreiras físicas são representadas pela cutícula externa matriz peritrófica, corpo gorduroso e hemolinfa (Amaral e Dansa-Petretski 2012; Hillyer, 2010).

As vias moleculares clássicas envolvidas na resposta de invertebrados a diversas classes de patógenos são a via TOLL e a via IMD. Elas foram descritas em *D. melanogaster* (Lemaitre, 1996; Ferradon *et al.*, 2007). Além destas vias clássicas, a via JAK/STAT também está associada à imunidade de insetos em estudos com *D. melanogaster* (Agaisse e Perrimon, 2004) e *An. gambiae* (Barillas-Mury *et al.*, 1999). Outro mecanismo responsável por regular resposta imune em mosquitos é o RNA de

interferência (iRNA), que é um fenômeno no qual duplas fitas de RNA (dsRNA) são degradadas em pequenas moléculas (siRNA), dando início ao silenciamento de genes de sequências homólogas (Amaral e Dansa-Petretski, 2012). Alguns estudos demonstraram e caracterizaram a resposta antiviral de iRNA à infecção por arbovírus de diversos gêneros em células cultivadas de *D. melanogaster*, *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* (Mueller *et al.*, 2010; Siu *et al.*, 2011; Léger *et al.*, 2013) e em adultos *D. melanogaster* e *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; Cirimotich *et al.*, 2009; Brackney *et al.*, 2009).

1.8 Capacidade vetorial

A capacidade vetorial está ligada a três determinantes: o vertebrado hospedeiro, o vetor e o parasito, e todos estes relacionados entre si e sofrendo influências do ambiente.

O conceito de capacidade vetorial foi originalmente descrito para o ciclo de transmissão envolvendo anofelinos e malária (Garret-Jones, 1964; Reisen, 1989; Forattini, 2002), no entanto pode servir para outros sistemas da relação patógeno-hospedeiro, como no caso de *Ae. aegypti* e o os arbovírus transmitidos por ele. A capacidade vetorial é a capacidade que uma população de vetor tem para transmitir um patógeno em um determinado espaço e tempo. É dado através de um cálculo do número médio de picadas por dia, competência vetorial, número médio de fêmeas de mosquito por pessoa, duração do período extrínseco de incubação do parasita e a taxa de sobrevivência diária do vetor (Garret-Jones, 1964; Forattini 2002). Trata-se, portanto de uma característica quantificável, expressa segundo uma fórmula, conforme a seguir:

$$CV = \frac{mbca^2P^n}{- \ln (P)}$$

onde a é o número de picadas por ser humano por dia; b é a probabilidade que um mosquito infectado tem de transmitir o parasito ao picar um hospedeiro humano susceptível; c é a probabilidade que um mosquito tem de se infectar com o parasito enquanto pica um hospedeiro humano infectado; m é o número de fêmeas de mosquito por pessoa, n é a duração do período extrínseco de incubação do parasito; e P é a taxa de sobrevivência diária do mosquito.

O número médio de picadas por dia depende da densidade do vetor e seu comportamento no ambiente. Vetores antropofílicos e endofílicos, por exemplo,

procuram o ser humano dentro das casas com frequência muito maior que aqueles zoófilos, que principalmente animais (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Esse fator é importante para se avaliar a capacidade vetorial, isso por que, quando associada à densidade pode mostrar a intensidade do contato entre o hospedeiro e o patógeno. O número médio de fêmeas de mosquito por pessoa influencia positivamente na transmissão de doenças. Isso por que quanto maior é a quantidade de espécimes em uma área, maior a chance de contato entre vetor e hospedeiro e a intensidade de transmissão.

A duração do período de incubação extrínseco do parasita é estimada pelo período de tempo em que o vetor alimentou-se de sangue infectado até o dia que em que as formas infectantes alcançam a saliva do inseto (Lourenço-de-Oliveira, 2015). Se o vetor apresentar um período de incubação muito longo, as chances de ocorrer transmissão diminuem, pois o inseto no ambiente pode sofrer diversos tipos de ações (ventanias, aplicação de inseticidas pelo ser humano) morrendo antes de se completar o ciclo.

A taxa de sobrevivência diária refere-se à capacidade de sobrevivência do vetor por dia, e como os outros fatores, são essenciais para se avaliar a dinâmica de transmissão de determinada doença. As fêmeas longevas são mais aptas a transmitir o patógeno, pois o mesmo necessita de um tempo para poder infectar, disseminar e ultrapassar todas as barreiras do vetor (Lourenço-de-Oliveira, 2015).

Um dos fatores incluídos na capacidade vetorial e discutidos neste trabalho e que contribui no processo de transmissão em determinada população, é a competência vetorial.

1.9 Competência Vetorial

A competência vetorial de um artrópode refere-se à capacidade que este tem em se infectar, permitir a replicação, disseminação e transmissão de patógenos. Diferentes linhagens de *Ae. aegypti*, por exemplo, apresentam grandes diferenças com relação à competência vetorial para flavivírus (Black *et al.*, 2002; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004). Para que isso ocorra é necessário que o patógeno seja capaz de atravessar diversas barreiras no hospedeiro invertebrado.

A competência vetorial pode ser estimada pela proporção de mosquitos que, tendo ingerido sangue com vírus, apresentam infecção disseminada após um tempo de incubação (Lourenço-de-Oliveira, 2015). Pode ser avaliada segundo indicadores

quantitativos: taxas de infecção, disseminação e transmissão, investigando-se a proporção dos indivíduos desafiados oralmente pelo vírus que tem a presença do vírus, respectivamente, no abdômen, ou em outras partes do corpo como cabeça, asas ou patas e, finalmente na saliva dos mosquitos (Lourenço-de-Oliveira, 2015).

Um inseto vetor pode apresentar competência vetorial relativamente baixa e ter razoável capacidade vetorial se sua densidade populacional, comportamento, longevidade, entre outros fatores, favoreçam o contato homem-vetor. Estas características biológicas positivas podem, portanto, compensar a baixa competência vetorial. Mas, um inseto que tem as características citadas de modo a facilitar a transmissão, mas não é competente para transmitir, sua capacidade vetorial é nula.

Populações brasileiras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* desafiados com cepa de ZIKV isolada de paciente na Nova Caledônia, por exemplo, foram susceptíveis ao vírus, no entanto apresentaram baixa taxa de transmissão (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016).

Muitos fatores podem contribuir para esta condição, por exemplo, a presença de barreiras próprias do inseto, capazes de impedir que o vírus se replique e dissemine para as glândulas salivares e que podem afetar consideravelmente a competência vetorial. Dentre essas barreiras se destacam: Barreira de infecção do intestino (MIB, do inglês *midgut infection barrier*), barreira de escape do intestino (MEB, do inglês *midgut escape barrier*) e a barreira de infecção das glândulas salivares (SGIB, do inglês *salivary gland infection barrier*) e barreira de escape das glândulas salivares (SGEB, do inglês *salivary gland escape barrier*) (Hard e Houk, 1983).

Na espécie de inseto que apresenta MIB, o vírus não consegue infectar as células do intestino ou quando infectam, ocorre baixa replicação (Figura 11). Nas espécies que apresentam barreira de infecção das glândulas salivares, o vírus, por não apresentar tropismo pelas células destes órgãos, não infectam as infectam. Uma vez que as glândulas salivares não estão contaminadas com o vírus, o mosquito não poderá transmiti-lo ao hospedeiro no momento do repasto sangüíneo (Black IV *et al.*, 2002; Bosio *et al.*, 1998; Bosio *et al.*, 2000).

Além das barreiras, outros fatores podem influenciar a competência vetorial, como o título do vírus no sangue ingerido (Pesko *et al.*, 2009, Gokhale *et al.*, 2015, Roundy *et al.*, 2017), as interações entre genótipos do vetor e do patógeno (GxG) (Lambrechts, 2009; 2011), triplas interações entre os genótipos do vetor e vírus e a temperatura ambiente (GxGxT), adaptação do vírus à população vetor (Lambrechts, 2009), entre outros.

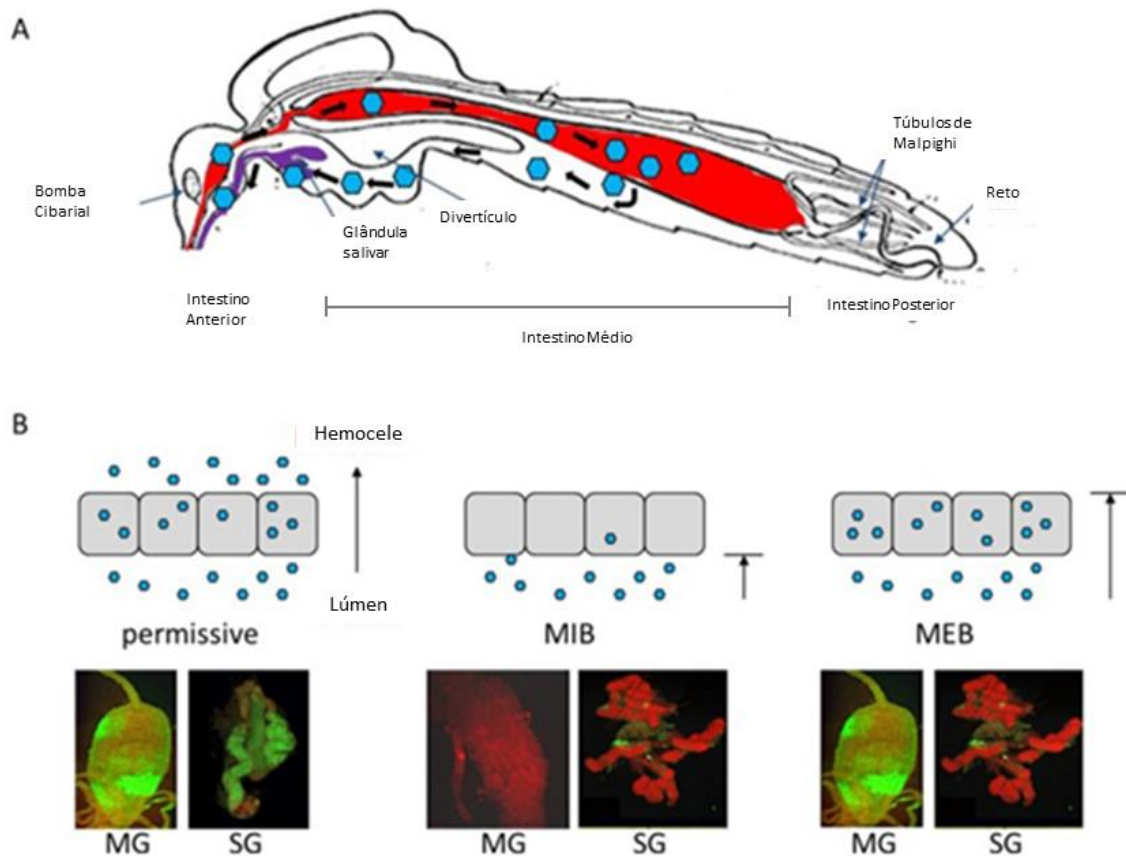


Figura 9: Infecção de um mosquito vetor por arbovírus. (A) Representação esquemática do tropismo tecidual de arbovírus em um mosquito vetor. Virions são representados por hexágonos azuis. (B) Representação esquemática de uma infecção permissiva do intestino médio, barreira da infecção do intestino médio (MIB) e barreira de escape do miocárdio (MEB). Os quadrados cinzentos representam as células epiteliais do intestino médio e os hexágonos azuis representam os virions. As imagens mostram a presença de antígeno de DENV2-Jamaica 1409 (verde) no intestino médio (aos 7 dias após infecção) ou glândulas salivares (aos 14 dias após a administração de sangue) de *Aedes aegypti*. Intestino médio (MG); glândula salivar (SG). Adaptado de Franz *et al* (2015).

A competência vetorial é determinada geneticamente. Portanto, indivíduos de uma mesma espécie e população podem se comportar diferentemente frente ao desafio oral representado pelo repasto infectante. Diferentes populações, de diferentes origens geográficas também podem apresentar diferenças na competência vetorial. Neste contexto, é importante que se determine a competência vetorial de diferentes populações de mosquitos de uma mesma espécie.

Em um cenário de circulação de um novo arbovírus, como no caso do ZIKV, a determinação do papel e competência vetorial de mosquitos vetores é de grande importância para o entendimento da dinâmica da transmissão.

1.10 O vetor *Aedes aegypti*

Mosquitos são insetos cujo desenvolvimento pós-embrionário ocorre por holometabolia, ou seja, apresentam metamorfose completa. Neste aspecto, exibem estágios diferenciados: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 9). Com exceção do último que é terrestre, os demais estágios são aquáticos. Somente as fêmeas sugam sangue, ao passo que os machos são fitófagos (Forattini, 2002, Chouin-Carneiro e Santos, 2017).

O *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) é um díptero da família *Culicidae* que teve sua origem na África e, posteriormente, dispersou para áreas com clima que favoreceram a sua proliferação (Forattini, 1962; Forattini, 1965). O *Ae. aegypti formosus* é uma subespécie mais associada ao ambiente selvagem, extradomiciliar e restrita à África, e uma mais clara, antropofílica e doméstica, que se dispersou pelo mundo, é *Ae. aegypti aegypti*, geralmente referida simplesmente como *Ae. aegypti*.

A dispersão do *Ae. aegypti* para o Novo Mundo se deu provavelmente durante o tráfego de escravos, nos séculos XVI e XVII, entre o oeste africano e a costa Americana e ilhas do Caribe. Mais tarde também se dispersou para a Ásia, os oceanos Índico e Pacífico. Encontra-se distribuído nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (Forattini, 1962; Clements, 1992; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Morfologicamente, *Ae. aegypti* é considerado um mosquito de porte médio, tem o corpo de coloração marrom escura, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). É um mosquito de hábito diurno e crepuscular, que apresenta estreita relação com o ser humano devido a sua preferência por sangue, por utilizar como criadouros os depósitos artificiais contendo água relativamente limpa, embora tenha sido observado também em ambientes poluídos (Clements, 1999).

A grande variedade de criadouros potenciais encontrada no peridomicílio e no intradomicílio garante a manutenção de densidades elevadas de *A. aegypti* no meio urbano onde o provimento de água encanada, a coleta de lixo e outras atividades relativas de saneamento básico não são regulares, potencializando os riscos de transmissão de doenças por esta espécie vinculadas (Forattini, 2002).

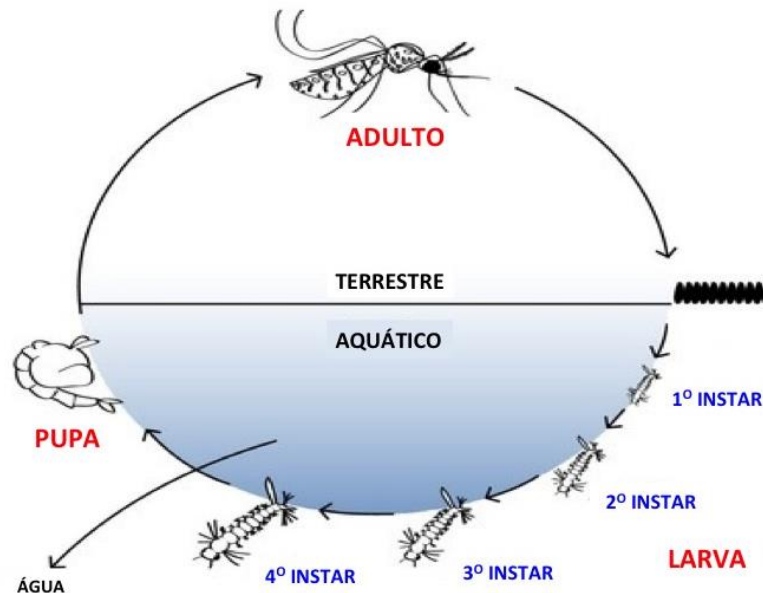


Figura 10: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Adaptado de Coon et al 2015.

Os ovos dos *Ae. aegypti* são elípticos, côncavos, de coloração esbranquiçada no momento da oviposição, tornando-se escuros após alguns minutos. São colocados aderidos à parede do recipiente, em local úmido e bem próximo da água parada ali acumulada. A “casca” dos ovos dos mosquitos é conhecida como cório, e o exocório geralmente apresenta ornamentações que auxiliam na identificação específica (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A resistência dos ovos à dessecação é devido à cutícula serosa, o que impede que a água escape do embrião (Telford, 1957; Konopova e Zrzavy, 2005; Vargas *et al.*, 2014). A presença de quitina na cutícula serosa também auxiliaria na proteção do embrião (Rezende *et al.*, 2008; Farnesi *et al.*, 2015).

A fase larvária dos mosquitos compreende quatro estágios que são essencialmente aquáticos de vida livre, além de serem dotados de grande mobilidade (Forattini 2002). As larvas têm aspecto vermiforme e coloração esbranquiçada, e seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Após aproximadamente três dias, as larvas eclodem e se alimentam continuamente no meio aquático como filtradoras não seletivas de partículas e raspadoras. Em condições normais, a duração de todo o período de desenvolvimento larval de *Ae. aegypti* varia de 8 a 10 dias quando a temperatura está em torno de 28°C (Forattini, 2002). No entanto, variações na temperatura, dieta e densidade podem explicar variações no desenvolvimento larvário (Couret *et al.*, 2014).

A larva de quarto estágio passa à fase pupal, durante a qual não se alimenta e se transforma no adulto (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Lourenço de Oliveira, 2015). Essa fase dura cerca de dois dias, desde que em condições normais (bruscas mudanças no clima e no criadouro). Em geral, os adultos-machos são menores que as fêmeas e emergem da pupa antes que estas últimas (Forattini, 2002).

Quando adultas, as fêmeas de *Ae. aegypti* se alimentam preferencialmente de sangue humano e os picos de atividade hematofágica ocorrem durante o crepúsculo matutino e vespertino (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). A maior atividade de oviposição ocorre nas primeiras horas do dia e ao anoitecer, quando a fêmea grávida deposita um pouco de seus ovos em vários criadouros, o que facilita a dispersão da espécie e a sua manutenção na natureza (Clements, 1999). Porém, é comum em *Ae. aegypti* a ocorrência de um fenômeno denominado discordância gonotrófica, quando mais de um repasto sanguíneo é necessário para a compleição da gestação e postura. Esse aspecto da biologia e comportamento do *Ae. aegypti* ocorre com mais frequência em adultos gerados em criadouros com elevado nível de competição por nutrientes e confere à espécie maior capacidade vetorial, pois aumentam as chances de contato mosquito-humanos.

1.11 *Culex quinquefasciatus*

O complexo de espécies *Cx. pipiens* compreende alguns dos mais importantes mosquitos vetores com distribuição global. Entre as espécies desse complexo estão *Cx. (Culex) pipiens* Linnaeus, 1758; *Cx. (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823; *Cx. (Culex) pallens* Coquillett, 1898 e *Cx. (Culex) australicus* Dobrotworsky & Drummond, 1953 (Smith e Fonseca, 2004). Geralmente, as áreas de regiões tropicais apresentam a espécie *Cx. quinquefasciatus* (Say) e de regiões temperadas são habitadas por *Cx. pipiens* (Linnaeus) (Vinogradova, 2000). Assim também ocorre nas Américas, sendo que no Brasil, a maior parte do território é ocupada por *Cx. quinquefasciatus*, enquanto que o *Cx. pipiens* ocorre em área subtropical e temperada meridional no continente sul-americano, como na Argentina. No entanto, áreas de sobreposição entre as duas espécies, com a ocorrência de híbridos, são reportadas.

Os adultos desse complexo são de coloração geral marrom clara, pardacenta, e possuem dorso pardo-escuro, com escamas amarelas, sem nenhuma ornamentação

notável (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). As pernas não têm manchas claras como em *Ae. aegypti*.

Embora possam realizar o repasto sanguíneo em aves ou em outros animais, as fêmeas do complexo *Pipiens* são de predominantemente antropofílicas e apresentam hábito estritamente noturno (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Se alimentam especialmente nas horas mais altas da noite. Tal como *Ae. aegypti*, buscam abrigos para a digestão do sangue, como locais escuros e protegidos de correntes de ar. Mas, diferentemente de *Ae. aegypti*, as fêmeas do complexo de espécies *Cx. pipiens* podem ser frequentemente vistas pousadas nas partes altas das paredes das casas ou no teto. Geralmente apresentam concordância gonotrófica, desovando três dias após o repasto.

O *Cx. quinquefasciatus* tem ampla distribuição no meio urbano, entre as faixas equatorial e tropical de todo o mundo (Bar, 1957). Semelhante ao *Ae. aegypti* e demais mosquitos, o *Cx. quinquefasciatus* é um inseto holometábolo, sendo o adulto alado e as formas pré-imaginais aquáticas. O seu ciclo biológico tem duração média maior que o de *Ae. aegypti*, ou seja, entre 10 a 12 dias, desde a eclosão das larvas até a emergência do adulto, porém a duração do ciclo depende de fatores como disponibilidade de alimento, temperatura, luz e umidade (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Diferente do *Ae. aegypti*, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* depositam seus ovos diretamente sobre a lâmina d'água dos criadouros (Figura 10). Os ovos são depositados agrupados, grudados uns aos outros sob a forma de jangada em número de 150 a 250 ovos em cada uma (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Esta jangada de ovos necessita estar constantemente em contato com a água, flutuando, não resistindo à dessecação.

As formas de larvas e pupas podem ser encontradas se desenvolvendo em água estagnada acumulada no solo, como em poças d'água, valas de drenagem de águas servidas e fossas, ou em recipientes, como latas e bebedouros de animais. Em ambas as categorias, a água é geralmente poluída, rica em matéria orgânica em decomposição, muitas vezes turva e malcheirosa (Forattini, 2002).

	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
Coloração	Coloração marrom escura, com faixas brancas nas bases dos seguimentos tarsais.	Em geral marrom clara, e possui o dorso pardo-escuro com escamas amarelas, não apresenta faixa brancas nos seguimentos.
Hábito	Diurno	Noturno
Hábito alimentar	Se alimenta no período matutino e crepuscular. Pica principalmente pernas e pés.	Se alimenta principalmente período noturno. Pica principalmente próximo aos membros superiores e face.
Criadouro	Depósitos de água parada (pouca matéria orgânica)	Depósitos de água suja com muito material orgânico
Reprodução	Apresenta discordância gonotrófica	Apresenta concordância gonotrófica
Postura	Deposita seus ovos próximo a água dos criadouros.	Deposita seus ovos diretamente sob a lâmina d'água dos criadouros
Ovos	Ovos dispostos nos criadouros de forma espalhada. Resistente à dessecação.	Agrupados sob a forma de jangada e necessita estar em contato com a água pois não resiste a dessecação.

Figura 11: Principais diferenças entre mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

Essas principais diferenças envolvendo o comportamento de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* são importantes pois os programas de controle do vetor seguem as características do *Ae. aegypti* (até o momento, é incriminado como o principal vetor do vírus zika). No entanto, se caso for comprovado que o *Cx. quinquefasciatus* possa estar envolvido na transmissão do ZIKV, todo o sistema de controle de mosquitos deve ser drasticamente alterado.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a competência vetorial de populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* ao ZIKV.

Objetivos Específicos

- Estimar comparativamente a competência vetorial de diferentes populações de *Cx. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro frente a dois isolados de ZIKV isoladas durante epidemia também ocorrida no Rio de Janeiro.
- Avaliar a susceptibilidade de populações de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de áreas que reportaram elevada incidência de microcefalia e outras manifestações neurológicas e congênitas associadas à infecção pelo ZIKV no NE, quando desafiadas com dois isolados de ZIKV da mesma região e de outras origens no Brasil; e a competência vetorial de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro frente os mesmos isolados de ZIKV usados nos experimentos com *Cx. quinquefasciatus*.
- Analisar a infectividade do ZIKV para mosquitos *Ae. aegypti* desafiados, por via oral, diretamente sobre macacos-rhesus virêmicos ou em sistema artificial contendo repastos sanguíneos, apresentando diferentes concentrações do vírus.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados sob a forma de três artigos científicos: um publicado, um aceito para publicação e outro em preparação para submissão.

3.1 Artigo 1: *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro is not Competent to Transmit the Local Zika Virus.

Referência Bibliográfica:

Rosilainy Surubi Fernandes, Stéphanie Silva Campos, Anielly Ferreira-de-Brito, Rafaella Moraes de Miranda, Keli Antunes Barbosa da Silva, Marcia Gonçalves de Castro, Lidiane M. S. Raphael, Patrícia Brasil, Anna-Bella Failloux, Myrna C. Bonaldo, Ricardo Lourenço-de-Oliveira. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis 2016; 10:1-13.

Situação do Manuscrito: Publicado na revista Plos One Neglected Tropical Diseases.

Resumo. Introdução: As Américas sofreram uma dramática epidemia de Zika desde maio de 2015, quando o vírus Zika (ZIKV) foi detectado pela primeira vez no Brasil. Os mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* subgênero *Stegomyia*, particularmente *Aedes aegypti*, são considerados os principais vetores de ZIKV. No entanto, a rápida disseminação do vírus em todo o continente suscitou várias preocupações sobre a dinâmica de transmissão, especialmente sobre os potenciais mosquitos vetores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a competência vetorial do mosquito *Culex quinquefasciatus* proveniente de uma área epidêmica de Zika, no Rio de Janeiro, Brasil, para isolados locais de ZIKV circulantes. Métodos: *Culex quinquefasciatus* e *Ae. Aegypti* (controle positivo da infecção por ZIKV) do Rio de Janeiro foram expostas oralmente a duas cepas de ZIKV isoladas de humanos do Rio de Janeiro (Rio-U1 e Rio-S1). Os mosquitos completamente ingurgitados foram mantidos em incubadoras a 26 ± 1 ° C, 12 h: ciclo de luz: escuro de 12 h e $70 \pm 10\%$ de umidade. Para cada combinação de mosquito-população ZIKV estirpe, 30 espécimes foram examinados para infecção, disseminação e taxas de transmissão, 7, 14 e 21 dias após a exposição

do vírus, analisando corpo (tórax mais abdómen), cabeça e saliva, respectivamente. As taxas de infecção foram de mínimas a completamente ausentes em todos os *Cx. quinquefasciatus* e foram significativamente elevados para *Ae. Aegypti*. Além disso, a disseminação e a transmissão não foram detectadas em qualquer *Cx. quinquefasciatus*, independentemente do período de incubação e do isolado ZIKV. Em contraste, *Ae. Aegypti* assegurou alta disseminação viral e transmissão moderada a muito alta. Conclusão: O mosquito *Cx. quinquefasciatus* do Rio de Janeiro não foi competente para transmitir isolados locais de ZIKV. Assim, não há evidência experimental de que *Cx. quinquefasciatus* desempenhe um papel na transmissão ZIKV. Consequentemente, pelo menos no Rio de Janeiro o controle de mosquitos para reduzir a transmissão de ZIKV deve permanecer focado em *Ae. aegypti*.

RESEARCH ARTICLE

Culex quinquefasciatus from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus

Rosilainy Surubi Fernandes¹✉, Stéphanie Silva Campos¹✉, Anielly Ferreira-de-Brito¹, Rafaella Moraes de Miranda¹, Keli Antunes Barbosa da Silva¹, Marcia Gonçalves de Castro¹, Lidiane M. S. Raphael², Patrícia Brasil³✉, Anna-Bella Failloux⁴, Myrna C. Bonaldo², Ricardo Lourenço-de-Oliveira¹*

1 Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças Febris Agudas, Instituto Nacional de Infectologia, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Institut Pasteur, Arboviruses and Insect Vectors, Paris, France

✉ These authors contributed equally to this work.

* lourenco@ioc.fiocruz.br


 OPEN ACCESS

Citation: Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RMd, Barbosa da Silva KA, Castro MGd, et al. (2016) *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis 10(9): e0004993. doi:10.1371/journal.pntd.0004993

Editor: Philip M. Armstrong, The Connecticut Agricultural Experiment Station, UNITED STATES

Received: June 28, 2016

Accepted: August 19, 2016

Published: September 6, 2016

Copyright: © 2016 Fernandes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was funded by CAPES-COFECUB COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (grant n. 799/14), the Institut Pasteur, the French Government's Investissement d'Avenir program, aboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n. ANR-10-LABX-62-IBEID), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (grant n. E-26/102.351/2013), Conselho Nacional de

Abstract

Background

The Americas have suffered a dramatic epidemic of Zika since May in 2015, when Zika virus (ZIKV) was first detected in Brazil. Mosquitoes belonging to subgenus *Stegomyia* of *Aedes*, particularly *Aedes aegypti*, are considered the primary vectors of ZIKV. However, the rapid spread of the virus across the continent raised several concerns about the transmission dynamics, especially about potential mosquito vectors. The purpose of this work was to assess the vector competence of the house mosquito *Culex quinquefasciatus* from an epidemic Zika area, Rio de Janeiro, Brazil, for local circulating ZIKV isolates.

Methodology/Principal Findings

Culex quinquefasciatus and *Ae. aegypti* (positive control of ZIKV infection) from Rio de Janeiro were orally exposed to two ZIKV strains isolated from human cases from Rio de Janeiro (Rio-U1 and Rio-S1). Fully engorged mosquitoes were held in incubators at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 h:12 h light:dark cycle and $70 \pm 10\%$ humidity. For each combination mosquito population—ZIKV strain, 30 specimens were examined for infection, dissemination and transmission rates, at 7, 14 and 21 days after virus exposure by analyzing body (thorax plus abdomen), head and saliva respectively. Infection rates were minimal to completely absent in all *Cx. quinquefasciatus*-virus combinations and were significantly high for *Ae. aegypti*. Moreover, dissemination and transmission were not detected in any *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes whatever the incubation period and the ZIKV isolate. In contrast, *Ae. aegypti* ensured high viral dissemination and moderate to very high transmission.

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant n. 309577/2013-6). National Institut of Health (grant n. 1UO1 AI115595-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions/Significance

The southern house mosquito *Cx. quinquefasciatus* from Rio de Janeiro was not competent to transmit local strains of ZIKV. Thus, there is no experimental evidence that *Cx. quinquefasciatus* likely plays a role in the ZIKV transmission. Consequently, at least in Rio, mosquito control to reduce ZIKV transmission should remain focused on *Ae. aegypti*.

Author Summary

The pandemic Zika epidemic has affected nearly all American countries. The etiological agent is a mosquito-borne-virus originated from Africa that spread to Asia and more recently, to the Pacific region and the Americas. We experimentally demonstrated that the common house nightly biting mosquito *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro was not susceptible to locally circulating Zika virus (ZIKV) strains. Dissemination was not observed in *Cx. quinquefasciatus* regardless of the ZIKV isolate used and the incubation period after the ingestion of an infected blood meal. No infectious ZIKV particle was detected in the saliva of the four *Cx. quinquefasciatus* populations examined until 3 weeks after virus exposure. In contrast, we confirmed that local *Aedes aegypti* mosquitoes can be infected, disseminate ZIKV at significantly high rates, and assured moderate to very high viral transmission after day 14 of virus exposure. We concluded that *Cx. quinquefasciatus* is not competent to transmit local ZIKV. Our results support that mosquito control should focus on *Ae. aegypti* to reduce Zika transmission.

Introduction

A Zika virus (ZIKV) epidemic has rapidly spread throughout tropical and subtropical zones of the American continent since early 2015 [1]. Brazil was likely the starting point of the Zika pandemic in the Americas [2, 3]. The Zika virus pandemic has spread to North America too. By July 2016, 45 American countries or territories have already reported active ZIKV transmission (<http://www.cdc.gov/zika/geo/active-countries.html>).

ZIKV is a positive-sense, single-stranded RNA mosquito-borne-virus of 10,807 nucleotides belonging to family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. It is composed of three major lineages: East African, West African, and Asian [4]. ZIKV was first isolated from a sentinel rhesus monkey in the Zika forest in Uganda in 1947 [5]. The second ZIKV isolations were obtained from 20 pools of the forest canopy feeder mosquito *Aedes (Stegomyia) africanus* captured in the same area [6].

Almost 70 years have passed and little is known about natural ZIKV vectors. *Aedes* mosquitoes are considered the primary vectors of ZIKV in Africa with reported viral isolations from several species, especially from *Ae. africanus* [1, 7–10]. ZIKV was also isolated from several other mosquito species belonging to genus *Aedes* (subgenera *Stegomyia* and *Diceromyia*), *Mansonia* and *Culex*, and horse flies from the wild in Uganda [8]. More recently, natural infections screened by molecular methods in sylvatic African mosquitoes were again predominantly found in *Aedes* belonging to subgenus *Stegomyia*, but also in other species of *Aedes*, *Mansonia*, *Culex*, *Anopheles* [9, 10]. Nevertheless, ZIKV transmission in the wild has remained poorly understood. Only two sylvatic species (*Ae. vittatus* and *Ae. luteocephalus*) proved to be able to transmit ZIKV in laboratory assays [11].

The domestic mosquito *Ae. (Stegomyia) aegypti* was early shown to be competent to experimentally transmit ZIKV [12]. Due to its high anthropophilic and domestic behaviors and virus detection in field caught specimens [13, 14], this mosquito has been incriminated as the urban and periurban vector in Africa and Asia [1,15].

ZIKV has only recently emerged outside of its natural distribution in Africa and Asia, and has caused a series of epidemics in urban and periurban sites on Pacific islands [16–20] before reaching the Americas, probably in 2013 [21]. The spreading virus belonged to the Asian genotype [21]. Despite multiple efforts, mosquito vectors involved in the ZIKV outbreaks across the Pacific Ocean in 2007–2015 were not identified. *Ae. aegypti* and other local members of subgenus *Stegomyia* (*Ae. hensilli* and *Ae. polynesiensis*) were thought to be potential vectors [16, 22, 23]. *Ae. (Stegomyia) albopictus* was found naturally infected with ZIKV in urban sites in Gabon in 2007 [24] and Mexico (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34243&lang=en). Additionally, *Ae. aegypti* from Singapore were competent to transmit the African ZIKV genotype in the laboratory [25]. Thereafter, *Ae. albopictus* has been considered a potential vector of ZIKV throughout its geographical range, concomitantly or not with *Ae. aegypti* [1, 24, 26, 27].

With the arrival of the ZIKV Asian genotype in the Americas, the global number of suspected and confirmed ZIKV cases reached levels never seen previously [28, 29]. Besides, the rapid geographical spread, the increased incidence of severe congenital troubles, such as microcephaly, and Guillain-Barré syndrome associated with ZIKV in Brazil led the World Health Organization to declare the ZIKV epidemic a Public Health Emergency of International Concern [1, 30]. ZIKV proved to have a high potential for geographic expansion in regions wherever *Ae. aegypti* mosquitoes are present, concomitantly with Dengue viruses 1–4 and Chikungunya virus prone areas of transmission, as it has occurred in Brazil and other American tropical and subtropical countries [29, <http://www.cdc.gov/zika/geo/active-countries.html>]. American *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* populations showed to be competent to transmit the ZIKV belonging to the circulating genotype, but displayed heterogeneous infection, dissemination and transmission rates in laboratory assays [26]. However, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* populations from Brazil and USA exhibited low transmission efficiency to ZIKV [26], which appeared inconsistent with the rapid Zika spread throughout the Americas. Two main hypotheses might explain this scenario: (1) The large number of humans susceptible to ZIKV combined with high densities of anthropophilic *Aedes* mosquitoes compensate their relatively low vector competence to ZIKV [26]. (2) Although the recent ZIKV pandemic has occurred only in *Stegomyia*-infested zones and *Ae. aegypti* has been suggested to be the main vector, other anthropophilic, domestic and usually abundant mosquitoes such as *Culex* species could contribute to ZIKV transmission [1, 31]. For example, *Culex* species belonging to the Pipiens Assemblage [32], such as *Cx. quinquefasciatus*, were likely candidate due their high human-biting frequency and distribution in urban epidemic centers (<http://www.reuters.com/article/us-health-zika-brazil-idUSKCN0W52AW>). There is no information whether *Cx. quinquefasciatus* can transmit the virus or the potential role of this mosquito in the ZIKV transmission in nature. We herein comparatively assess the vector competence of *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* populations from Rio de Janeiro for two local ZIKV isolates.

Materials and Methods

Mosquitoes

Cx. quinquefasciatus populations tested in this study were collected from four districts of Rio de Janeiro: Manguinhos (MAN, 22°52'20"S 43°14'46"W), Triagem (TRI, 22°53'56"S 43°14'44"W) Copacabana (COP, 22°58'8.3"S 43°11'21"W) and Jacarepaguá (JAC, 22°57'42"S 43°

24°11'W). For comparison, we used two populations of *Ae. aegypti* from Rio de Janeiro, Brazil: Urca (URC, 22°56'45"S 43°09'43"W) and Paqueta (PAQ, 22°45'44"S 43°06'26"). The mosquitoes were concurrently collected as larvae or eggs using ovitraps from January to March 2016 to initiate laboratory colonies. Each colony was started with at least 200 field-collected individuals from more than five distinct collecting sites and traps. Field collected larvae and eggs were hatched and reared in insectaries (26 ± 1°C; 70 ± 10% RH; 12 h:12 h light:dark cycle). Larvae were reared in pans (~100 larvae/pan measuring 30 x 21 x 6 cm) containing 1 liter of dechlorinated tap water supplemented with yeast tablets. Adults were kept under the same insectary controlled conditions described above, and supplied with a 10% sucrose solution. All experimental oral infections were performed with mosquitoes of the F1 generation, except for TRI (laboratory colony) and PAQ (F2).

Viral strains

Mosquitoes were challenged with two ZIKV strains of the Asian genotype, named Rio-U1 and Rio-S1, respectively isolated from urine and saliva of two patients in January 2016, living in distinct districts in Rio de Janeiro [33]. The viral samples were isolated, kept anonymized and provided by Bonaldo et al. [33], whose the institutional review board at Fundação Oswaldo Cruz has previously approved their study protocol. Viral stocks were obtained after two passages of the isolates onto Vero cells maintained with Earle's 199 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), under an atmosphere containing 5% CO₂, and incubated at 37°C. Viral titer in supernatants were estimated by plaque-forming unit (PFU) assays of serial dilutions on Vero cells maintained at 37°C for 7 days and expressed in PFU/mL. Samples were kept at -80°C until use. The comparison of genomic sequences of ZIKV strains Rio-U1 (KU926309) with Rio-S1 (KU92630) yielded 99.6% identity, displaying six amino acid variations in the viral proteins. Phylogenetic analysis showed 99.7% identity of Rio-U1 and Rio-S1 strains with ZIKV isolates from Guatemala and other Brazil regions, including a Zika-associated microcephaly case. They all cluster (bootstrap score = 97%) within the Asian genotype and share a common ancestor with the ZIKV strain that circulated in French Polynesia in November 2013 [33].

Mosquito experimental assays

Five to seven day-old females were isolated in feeding boxes and starved for 24 h and 48 h for *Aedes* and *Culex* mosquitoes, respectively. All mosquitoes were exposed to the infectious blood-meal containing a final viral titer of 10⁶ PFU/mL which consists of a mixture of two parts of washed rabbit erythrocytes and one part of the viral suspension added with a phagostimulant (0.5 mM ATP). Females were fed through a pig-gut membrane covering the base of glass feeders containing the infectious blood-meal maintained at 37°C. Mosquito feeding was limited to 60 min. Only fully engorged females were incubated at 26°C constant temperature, 70 ± 10% RH and 12 h:12 h light:dark cycle, with daily access to 10% sucrose solution. When available, samples of 30 mosquitoes of each population were examined at 7, 14 and 21 days after virus exposure, hereinafter abbreviated as "dpi".

Mosquitoes were individually processed as follows: abdomen and thorax (herein after referred to as body) were examined to estimate viral infection rate, head for dissemination and saliva for transmission. Each female was handled at a time, by using disposable and disinfected supplies to avoid contamination between individuals and between tissues of the same mosquito as previously described [34]. For the determination of viral infection and dissemination rates, each mosquito body and head were respectively ground in 500 µL and 250 µL of medium supplemented with 4% FBS, and centrifuged at 10,000 x g for 5 min at +4°C before titration. Body and head homogenates were serially diluted and inoculated onto monolayers of Vero cells in

96-well plates. After 1 h incubation of homogenates at 37° C, 150 µL of 2.4% CMC (carboxy-methyl cellulose) in Earle's 199 medium was added per well. After 7 days incubation at 37° C, cells were fixed with 10% formaldehyde, washed, and stained with 0.4% crystal violet. Presence of viral particles was assessed by detection of viral plaques. Additionally, body and head homogenates were individually submitted to specific ZIKV RNA detection and quantification through RT-qPCR, using the SuperScript III Platinum one-step RT-qPCR (Invitrogen) in QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For each reaction, we used 600 nM forward primer (5'-CTTGAGTGCTTGTGATT-3', genome position 3451–3468), 600 nM reverse primer (5'-CTCCTCCAGTGTTTCATTT-3', genome position 3637–3620) and 800 nM probe (5'-FAM-AGAAGAGAATGACCACAAAAGATCA-3'-TAMRA, genome position 3494–3517). The sequences of this primer set were provided by Isabelle Lepark-Goffart (French National Reference Centre for Arboviruses, IRBA, Marseille, France). The reverse transcription was performed at 45° C for 15 min. The qPCR conditions were 95° C for 2 minutes, followed by 40 amplification cycles of 95° C for 15 sec, 58° C for 5 sec and 60° C for 30 sec. For each run, numbers of ZIKV RNA copies were calculated by absolute quantitation using a standard curve, whose construction details are described elsewhere [33].

In order to assess the transmission rate (TR) and transmission efficiency (TE), mosquito saliva was collected in individual pipette tips containing 5 µL FBS and processed by PFU assays, as previously described [26]. Accordingly, mosquito saliva was inoculated onto Vero Cell monolayer in 6-well plates incubated 7 days at 37° C, under 3 mL with 2.4% CMC in Earle's 199 medium overlay, and stained as described above. Viral titers of saliva were expressed as PFU/saliva.

Infection rate (IR) refers to the proportion of mosquitoes with infected body (abdomen and thorax) among tested mosquitoes. Disseminated infection rate (DIR) corresponds to the proportion of mosquitoes with infected head among tested mosquitoes (i.e.; abdomen/thorax positive). Transmission efficiency (TE) represents the proportion of mosquitoes with infectious saliva among the initial number of mosquitoes tested. Transmission rate (TR) represents the proportion of mosquitoes with infectious saliva among mosquitoes with disseminated infection.

Statistical analysis

To compare the viral load, the Wilcoxon signed rank test was adopted to analyze pairwise comparison at 7, 14 and 21 dpi for each mosquito population and tested virus strain. Significant difference was established when p-values were lower than 0.05. Data analyses were conducted with PRISM 5.0 software (GraphPad Software, San Diego-CA, USA, 2007).

Ethics statements

This study was approved by the Institutional Ethics Committee on Animal Use (CEUA-IOC license LW-34/14) at the Instituto Oswaldo Cruz. No specific permits were required for performing mosquito collection in the districts in Rio de Janeiro.

Results

Culex quinquefasciatus infrequently become infected with ZIKV

We comparatively evaluated the susceptibility to infection of *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* from Rio de Janeiro to two ZIKV strains locally isolated. Infection rates (IR) were negligible to null in *Cx. quinquefasciatus*, whereas they remained very high for *Ae. aegypti*, (Fig 1A). With few exceptions, the IRs were of 100% in the two tested *Ae. aegypti* populations (URC and

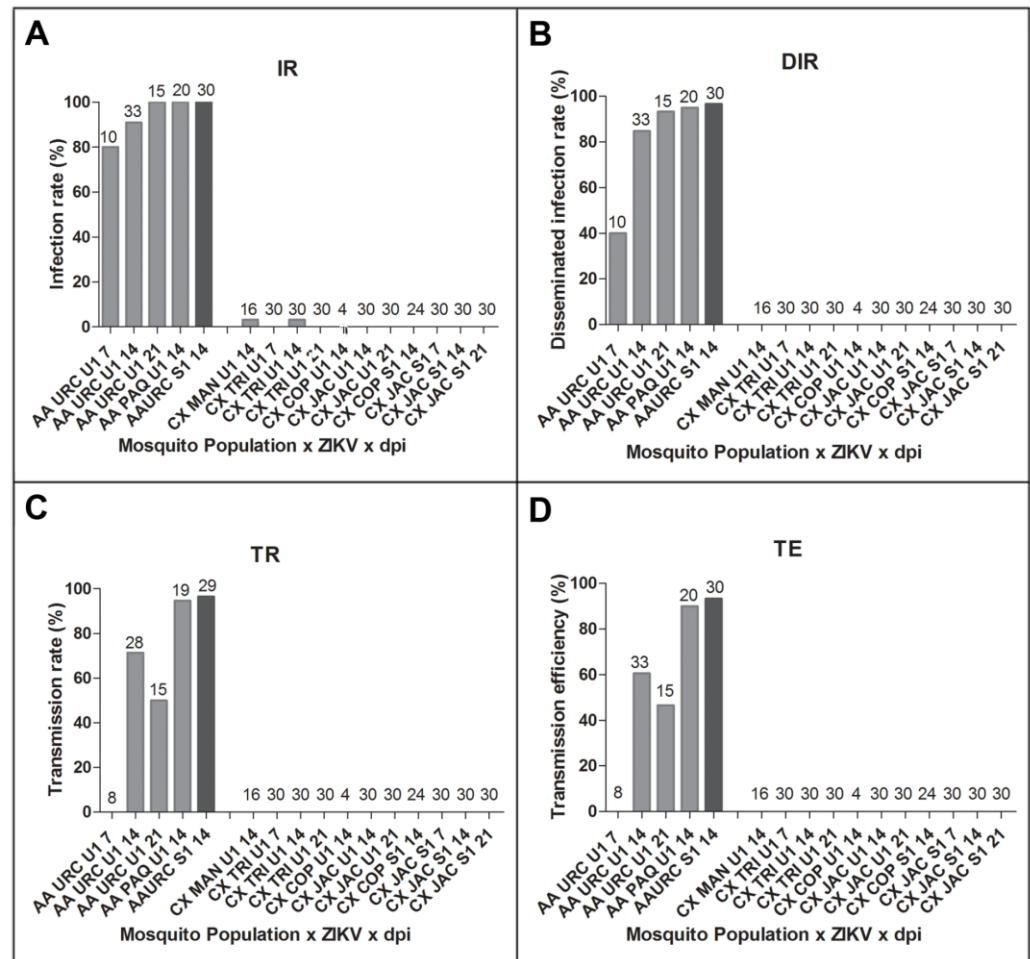


Fig 1. Viral infection (A), dissemination (B), transmission (C, D) at days 7, 14 and 21 after challenge of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro, Brazil, with two locally circulating ZIKV isolates (Rio-U1 and Rio-S1) provided at a titer of 10^6 PFU/mL. Infection rate (IR) refers to the proportion of mosquitoes with infected body (abdomen and thorax) among tested mosquitoes. Disseminated infection rate (DIR) corresponds to the proportion of mosquitoes with infected head among tested mosquitoes (i.e.; abdomen/thorax positive). Transmission efficiency (TE) represents the proportion of mosquitoes with infectious saliva among the initial number of mosquitoes tested. Transmission rate (TR) represents the proportion of mosquitoes with infectious saliva among mosquitoes with disseminated infection. The number of individuals analyzed is given on top of bars.

doi:10.1371/journal.pntd.0004993.g001

PAQ) at 14 and 21 dpi, for both virus isolates. In addition, when examining *Ae. aegypti* from URC, 80% have already been infected by 7 dpi (Fig 1A). In contrast, none of the four *Cx. quinquefasciatus* populations was likely to become infected except for 1 of 30 TRI *Cx. quinquefasciatus* challenged with ZIKV Rio-U1, at 14 dpi (viral load: 1,814 RNA copies/ml; 7.0 PFU/ml) (Fig 1A). ZIKV RNA copies (1,453 RNA copies/ml) were detected in 1 of 16 MAN *Cx. quinquefasciatus* at 14 dpi challenged with the same ZIKV strain. However infective viral particles were not detected in the homogenate of this specimen in repeated PFU assays. Viral load estimated in bodies of *Ae. aegypti* tended to increase with incubation time (Fig 2), and the lowest values being detected at 7 dpi (median: 1.1×10^6 RNA copies/ml, mean \pm SE: $2.3 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^6$ RNA copies/ml) and the highest at 21 dpi (median: 1.5×10^9 RNA copies/ml, mean \pm SE:

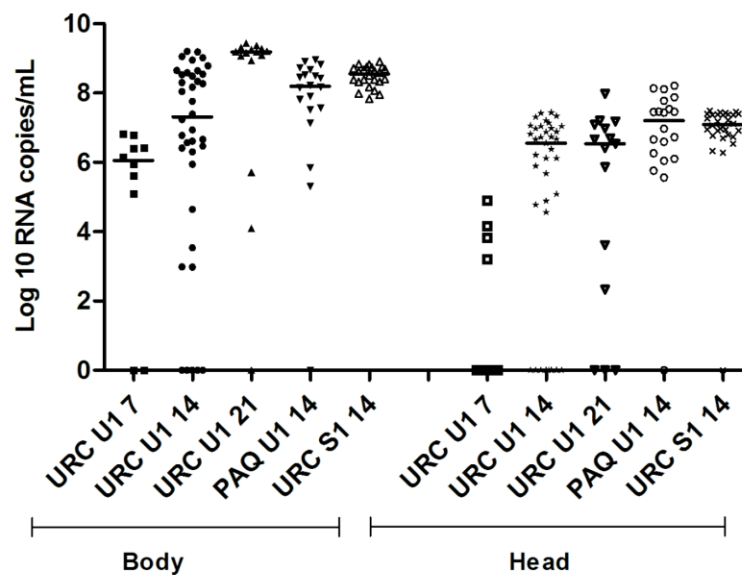


Fig 2. ZIKV load in bodies and heads of *Ae. aegypti* from Rio de Janeiro, Brazil, 7, 14 and 21 days after challenge with two locally circulating ZIKV isolates (Rio-U1 and Rio-S1) provided at a titer of 10^6 PFU/mL. Viral RNA copies were determined by qPCR in mosquito homogenates. Viral loads with value 0 actually represents mosquitos with viral loads < 40 RNA copies/ml.

doi:10.1371/journal.pntd.0004993.g002

$1.3 \times 10^9 \pm 8.3 \times 10^8$ RNA copies/ml). Accordingly, viral load was significantly higher at 21 dpi than at 7 ($p = 0.0098$) and 14 dpi ($p = 0.009$). Viral loads at 14 dpi in bodies of *Ae. aegypti* from PAQ [IR: 100%, Fig 1; viral load: 1.6×10^8 RNA copies/mL (median); $2.6 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^8$ RNA copies/mL (mean \pm SE), Fig 2] were significantly higher than for URC [IR: 90.9%, Fig 1, viral load: 2.1×10^7 RNA copies/mL (median); $2.6 \times 10^8 \pm 4.3 \times 10^8$ RNA copies/mL (mean \pm SE), Fig 2] when challenged with the same ZIKV isolate (Rio-U1).

The circulating ZIKV can promptly disseminate and efficiently be transmitted by *Ae. aegypti*, but not by *Cx. quinquefasciatus* from Rio

Cx. quinquefasciatus did not showed viral dissemination regardless of the incubation period whereas dissemination infection rates (DIR) were consistently high (~85–97%) in *Ae. aegypti* at 14 and 21 dpi irrespective the ZIKV strain (Fig 1B). Accordingly, transmission determined by detecting infective viral particles in mosquito saliva was not observed in any pair of *Cx. quinquefasciatus* population-ZIKV strain regardless the time point of examination (Fig 1C). In contrast, significantly high transmission rates (TR: 71.6–96.5%) and transmission efficiency (TE: 60.6–93.3%) were observed in local *Ae. aegypti* (PAC and URC) at 14 dpi (Fig 1C and 1D).

At 14 dpi, viral load in the head of *Ae. aegypti* from URC infected with ZIKV Rio-S1 (Fig 2) were significantly higher (median: 1.2×10^7 RNA copies/mL; mean \pm SE: $1.4 \times 10^7 \pm 9.5 \times 10^6$ RNA copies/mL) compared to ZIKV Rio U1 (median: 3.6×10^6 RNA copies/mL mean \pm SE: $6.3 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^6$ RNA copies/mL, Fig 2) ($p = 0.0003$). When challenged with the same ZIKV isolate (Rio-U1), viral load in heads at 14 dpi was significantly higher in *Ae. aegypti* from PAQ (median: 1.8×10^7 RNA copies/mL, mean \pm SE: $3.7 \times 10^7 \pm 5.0 \times 10^7$ RNA copies/mL, Fig 2) than URC ($p = 0.0018$). As expected, DIR was lower (DIR = 40%) in *Ae. aegypti* (URC) at 7 dpi, and no transmission was observed at this time point (Fig 1B–1D). TRs and TEs at 14 dpi

were higher for PAQ compared to URC *Ae. aegypti* challenged with the same ZIKV isolate (Rio-U1) (Fig 1C and 1D), although viral load did not differ ($p = 0.4203$) between mosquito populations (Fig 3). Also, comparisons of viral loads in saliva of URC *Ae. aegypti* challenged with different ZIKV isolates did not show any difference (40.3 ± 64.5 PFU Rio-S1/saliva versus 34.2 ± 69.0 PFU Rio-U1/saliva; $p = 0.3388$) (Fig 3). No significant difference was apparent ($p = 0.2212$) in viral load in saliva between 14 and 21 dpi (Fig 3).

Discussion

The Zika epidemics has affected nearly all American countries with ca. 445,000 cumulative suspected cases, with 91,962 confirmed infections and 9 deaths due to ZIKV as of August 5, 2016 (http://ais.paho.org/hip/viz/ed_zika_cases.asp). South American countries had nearly 74% of the continental Zika suspected cases, with ca. 5% (165,932 suspected cases) from Brazil. The incidence rate in Brazil is 81.2/100,000 inhabitants Zika suspected cases, with 1,749 cases of microcephaly associated to ZIKV infection diagnosed by clinical, epidemiological and/or laboratory criteria as of May 2016 (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691). Rio de Janeiro is one of the highest risk areas in Brazil, with an incidence of 278.1/100,000 suspected Zika cases as of July 2016 (<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/15/2016-boletim-epi-n28-dengue-chik-zika-se23.pdf>).

To face such a severe health crisis, efficient and effective mosquito control strategies are essential. However, it depends on the definition of primary and/or potential local mosquito vectors. Other ZIKV transmission mechanisms besides *Ae. aegypti* have been observed. For instance, sexual ZIKV transmission between humans has been observed [35]. Natural ZIKV infections detected in several mosquito genera and even in horse flies would suggest that ZIKV could potentially infect a large range of mosquito species and even other hematophagous flies [31, 33, 36]. However, there is no evidence regarding the role of other mosquitoes or flies besides *Aedes (Stegomyia)* species in the ZIKV transmission in nature in the Americas. Indeed, there are no data whether other anthropophilic and domestic mosquitoes besides *Ae. albopictus*, and notably *Ae. aegypti* can transmit ZIKV.

In this work, we demonstrate for the first time, under laboratory conditions, that *Cx. quinquefasciatus* are not competent to transmit two ZIKV strains circulating in Brazil. Four tested populations were minimally infected with ZIKV and were unable to transmit this virus. In contrast, two *Ae. aegypti* populations were highly susceptible to ZIKV infection and dissemination, and competent to transmit the same virus strains. This is consistent with *Ae. aegypti* being more likely to sustain the current ZIKV outbreak in Rio de Janeiro and probably in other tropical American zones.

The Zika control program in Brazil, as well as in all epidemic American countries, consists essentially in intensifying and reinforcing the current strategies to control dengue for decades, which focuses in reducing *Ae. aegypti* density and longevity through eliminating or treating potential larval habitats and insecticide spraying (<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>). However, the traditional vector control strategies have usually failed to efficiently reduce dengue transmission and spread, even when properly adopted [38]. Several reasons have been identified to explain these failures, among which are insufficient community engagement and management and high insecticide resistance in the target species, the mosquito *Ae. aegypti* [39–41]. Intensifying *Ae. aegypti* control activities has also been unsuccessful in stemming the rapid spread of ZIKV [1]. Therefore, new technologies are urgently needed to adequately and better mitigate ZIKV transmission, likely requiring combinations of several approaches. For instance, it has been recently demonstrated that *Wolbachia*-

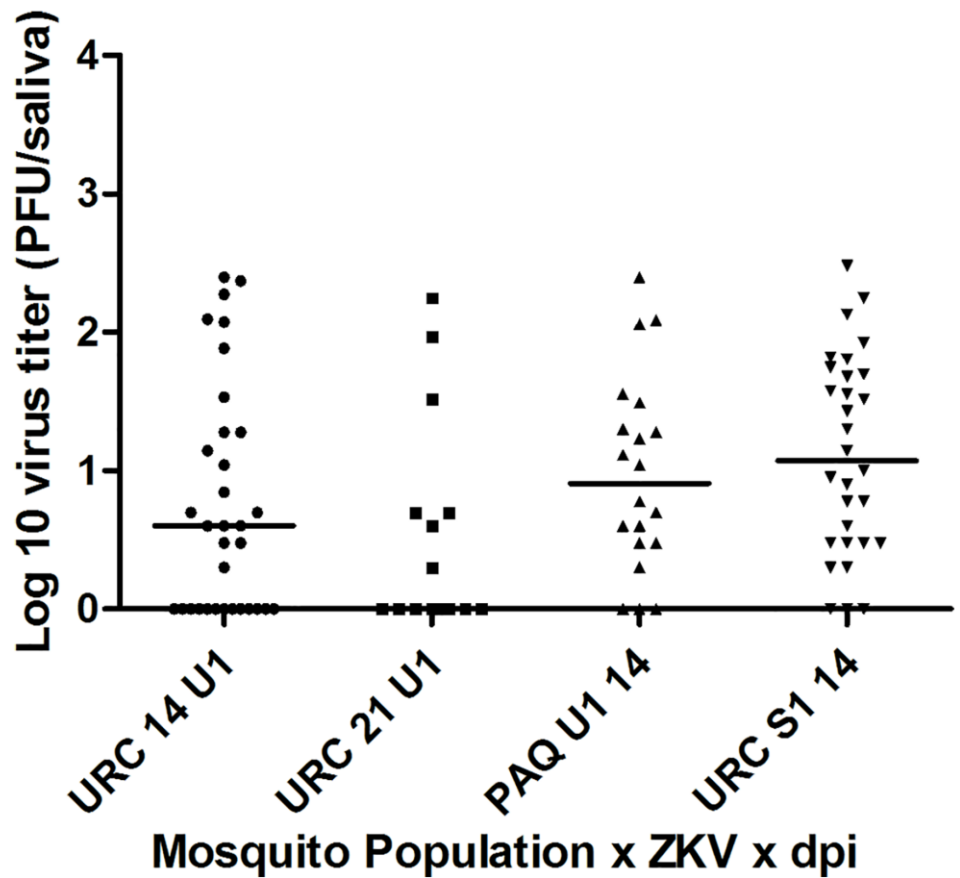


Fig 3. ZIKV load in saliva of *Ae. aegypti* from Rio de Janeiro, Brazil, 14 and 21 days after challenge with two locally circulating ZIKV isolates (Rio-U1 and Rio-S1) provided at a titer of 10^6 PFU/mL. Virus was detected plaque forming unit (PFU) assays on Vero cells.

doi:10.1371/journal.pntd.0004993.g003

infected *Ae. aegypti* from Brazil blocks ZIKV transmission [42]. In addition, local control programs should design specific control strategies against the potential vector *Ae. albopictus*, since it has been shown to transmit ZIKV in laboratory [25, 26, 37], with ZIKV detections in field-collected specimens [24, http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34243&lang=en].

The first determination of vector competence to ZIKV in American *Ae. aegypti* populations was conducted with a viral isolate from New Caledonia, as at the time of that evaluation, no local ZIKV strain were available. Nonetheless, the sequence of NS5 gene of ZIKV from New Caledonia displayed 99.4% identity with ZIKV from Brazil [26]. One Brazilian *Ae. aegypti* population, from Tubiacanga, Rio de Janeiro were challenged with the ZIKV New Caledonia. High susceptibility to infection and moderate dissemination rate, but with low transmission were found, suggesting unexpectedly low competence of local *Ae. aegypti* for ZIKV [26]. Our newly data with two *Ae. aegypti* populations from Rio de Janeiro (URC and PAC) orally challenged with two locally circulating ZIKV isolates (Rio-U1 and Rio-S1) revealed very high dissemination and moderate to high transmission. Similar results were found when testing the URC mosquito population with two ZIKV strains isolated in 2015 from other Brazilian cities [42]. These

differences in vector competence may be explained by the concept that the outcome of transmission depends on the specific pairing of vector and virus genotypes [43]. Similar to other ZIKV strains isolated during the epidemic in Brazil, sequences of virus strains used in the present study clustered with Asian clade, including sequences from New World, Malaysia, Micronesia and Pacific. Thus, the New Caledonian [26] and Brazilian strains are genetically nearly identical. Phylogenetic and molecular clock analyses are consistent with a single introduction of ZIKV from the Pacific area into the Americas, probably more than 12 months before the detection of ZIKV in Brazil [21]. It is possible that some genome evolution not yet identified has rapidly shaped ZIKV to New World *Ae. aegypti* populations, highlighting the genetic specificity and potential for local adaptation between arboviruses and mosquito vectors previously described for dengue [44].

To evaluate the potential role of a mosquito species to transmit an arbovirus like ZIKV requires examination of multiple components governing vectorial capacity, of which vector competence is simply one. Ecological, epidemiological, environmental and climatic factors influence both vector competence and vectorial capacity. Thus, distinct geographical populations of a mosquito species can greatly diverge in their vector competence when exposed to different virus strains, since the outcome of infection depends on the specific combination of mosquito and virus genotypes [45, 46]. Thus, our demonstration that *Cx. quinquefasciatus* from Rio are not able to transmit ZIKV does not completely rule out the possibility that domestic *Culex* mosquitoes from other origins may exhibit different vector competence.

Nevertheless, to now at least, there is no evidence that the southern house mosquito *Cx. quinquefasciatus* is a potential ZIKV vector. Our study with four *Cx. quinquefasciatus* populations from Rio challenged with two recently isolated virus strains from the same location where mosquitoes were collected showed that this species is not competent to transmit ZIKV. Similar result was obtained when the closely related species *Cx. pipiens* from USA was challenged with a ZIKV isolated from Puerto Rico [47]. Moreover, besides being incompetent to transmit ZIKV in the laboratory, neither *Cx. quinquefasciatus* nor any other species of the Pipiens Assemblage has been found naturally infected in the American ZIKV transmission area [48, 49] or during the 2007 Zika outbreaks in the South Pacific island of Yap (Micronesia) [1, 16] and in Gabon [24] where thousands of *Cx. quinquefasciatus* have been screened.

Therefore, there is no reason to think that mosquito control efforts against *Cx. quinquefasciatus* to reduce Zika transmission, at least in Rio de Janeiro, Brazil. Mosquito measures to mitigate ZIKV transmission should remain focused on *Ae. aegypti*.

Acknowledgments

The authors thank Elaine E. de Moura, Alexandre A. C. dos Santos, Filipe Vieira Santos de Abreu for technical support. Cátia Cabral, José Bento Lima, Cynara Rodvalho and Maria Ignês Bersot for providing some of the tested mosquito populations. Jeffrey Powell and the reviewers for correcting the manuscript. Isabelle Lepark-Goffart for gently providing the sequences of primer set.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RLdO PB ABF.

Performed the experiments: RLdO RSF SSC AFdB KABdS RMdM MGdC LMSR.

Analyzed the data: RLdO RSF MCB.

Contributed reagents/materials/analysis tools: RLdO MCB.

Wrote the paper: RLdO ABF PB MCB.

References

1. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(3):487–524. doi: [10.1128/CMR.00072-15](https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15) PMID: [27029595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27029595/)
2. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Apr 12; 10(4):e0004636. doi: [10.1371/journal.pntd.0004636](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004636) PMID: [27070912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27070912/)
3. Zanluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(4):569–72. doi: [10.1590/0074-02760150192](https://doi.org/10.1590/0074-02760150192) PMID: [26061233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26061233/)
4. Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(1):e2636. doi: [10.1371/journal.pntd.0002636](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636) PMID: [24421913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24421913/)
5. Dick GW. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; 46(5):521–34. PMID: [12995441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12995441/)
6. Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; 46:509–20. PMID: [12995440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12995440/)
7. Weinbren MP, Williams MC. 1958. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1958; 52(3): 263–8. PMID: [13556872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13556872/)
8. Haddock AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull World Health Organ.* 1964; 31:57–69. PMID: [14230895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14230895/)
9. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in south-eastern Senegal, 2011. *PLoS One.* 2014; 9(10):e10944.
10. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology.* 2013; 10:311. doi: [10.1186/1743-422X-10-311](https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-311) PMID: [24148652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24148652/)
11. Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:492. doi: [10.1186/s12879-015-1231-2](https://doi.org/10.1186/s12879-015-1231-2) PMID: [26527535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527535/)
12. Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956; 50(3):238–42. PMID: [13337908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13337908/)
13. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969; 18(3):411–5. PMID: [4976739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4976739/)
14. Akoua-Koffi C, Diarrassouba S, Benie VB, Ngbichi JM, Bozoua T, Bosson A, et al. [Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Cote d'Ivoire in 1999]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2001; 94(3):227–30. PMID: [11681215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11681215/)
15. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75(3):389–93. PMID: [6275577](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6275577/)
16. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009; 360(24):2536–43. doi: [10.1056/NEJMoa0805715](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715) PMID: [19516034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19516034/)
17. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(6):1085–6. doi: [10.3201/eid2006.140138](https://doi.org/10.3201/eid2006.140138) PMID: [24856001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856001/)
18. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(2):381–2. doi: [10.3201/eid2102.141553](https://doi.org/10.3201/eid2102.141553) PMID: [25625687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25625687/)
19. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol.* 2015.
20. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(10):O595–6. doi: [10.1111/1469-0691.12707](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707) PMID: [24909208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24909208/)
21. Faria NR, Azevedo R do S., Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 2016; 352: 345–349. doi: [10.1126/science.aaf5036](https://doi.org/10.1126/science.aaf5036) PMID: [27013429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27013429/)

22. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M, Machieng P, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 9; 8(10):e3188. doi: [10.1371/journal.pntd.0003188](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003188) PMID: [25299181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25299181/)
23. Ios S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect*. 2014 Jul; 44(7):302–7. doi: [10.1016/j.medmal.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008) PMID: [25001879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25001879/)
24. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)-2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(2):e2681. doi: [10.1371/journal.pntd.0002681](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681) PMID: [24516683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24516683/)
25. Wong PS, Li MZ, Chong CS, Ng LC, Tan CH. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(8):e2348. doi: [10.1371/journal.pntd.0002348](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002348) PMID: [23936579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23936579/)
26. Chouin-Cameiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3):e0004543. doi: [10.1371/journal.pntd.0004543](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004543) PMID: [26938868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26938868/)
27. WHO. A review of Vectors of Zika—Aedes. Available from: <http://who.int/features/2016/Aedes-Competency-ZIKAV.pdf>.
28. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*. 2016; 130:69–80. doi: [10.1016/j.antiviral.2016.03.010](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010) PMID: [26996139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26996139/)
29. Garcia E, Yactayo S, Nishino K, Millot V, Perea W, Brianda S. Zika virus infection: global update on epidemiology and potentially associated clinical manifestations. *Wkly Epidemiol Rec*. 2016; 91(7):73–81. PMID: [26897760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26897760/)
30. Noronha Ld, Zanluca C, Azevedo ML, Luz KG, Santos CN. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(5):287–93. doi: [10.1590/0074-02760160085](https://doi.org/10.1590/0074-02760160085) PMID: [27143490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27143490/)
31. Musso D, Baud D, Gubler DJ. Zika virus: what do we know? *Clin Microbiol Infect*. 2016. pii: S1198-743X(16)30050-7.
32. Harbach RE. *Culex pipiens*: species versus species complex taxonomic history and perspective. *J Am Mosq Control Assoc*. 2012; 28(4 Suppl):10–23. PMID: [23401941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401941/)
33. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Santos AAC, Menezes LSR, Cruz SOD. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(6):e0004816. doi: [10.1371/journal.pntd.0004816](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004816) PMID: [27341420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27341420/)
34. Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux AB. Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(6):e706. doi: [10.1371/journal.pntd.0000706](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706) PMID: [20544013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20544013/)
35. Hills SL, Russell K, Hennessey M, et al. Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission—continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65:215–6. doi: [10.15585/mmwr.mm6508e2](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6508e2) PMID: [26937739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26937739/)
36. Ayres CF. Identification of Zika virus vectors and implications for control. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16(3):278–9. doi: [10.1016/S1473-3099\(16\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00073-6) PMID: [26852727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26852727/)
37. Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109(6):787–96. PMID: [25317707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25317707/)
38. Maciel-de-Freitas R, Valle D. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil. *Bull World Health Organ*. 2014; 92(9):685–9. doi: [10.2471/BLT.13.119081](https://doi.org/10.2471/BLT.13.119081) PMID: [25378760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25378760/)
39. Lourenço-de-Oliveira R. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: Yellow fever in 1908 and dengue in 2018. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:627–8. PMID: [19057810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19057810/)
40. Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, Lima JB et al. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS One*. 2014; 9(3):e92424. doi: [10.1371/journal.pone.0092424](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092424) PMID: [24676277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24676277/)
41. Chediak M, G Pimenta F Jr, Coelho GE, Braga IA, Lima JB, Cavalcante KR, et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111: 311–321. doi: [10.1590/0074-02760150409](https://doi.org/10.1590/0074-02760150409) PMID: [27143489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27143489/)
42. Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016; 19(6):771–4. doi: [10.1016/j.chom.2016.04.021](https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.021) PMID: [27156023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156023/)

43. Fansiri T, Fontaine A, Diancourt L, Caro V, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, et al. Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. *PLoS Genet.* 2013; 9(8):e1003621. doi: [10.1371/journal.pgen.1003621](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003621) PMID: [23935524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23935524/)
44. Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol.* 2009; 9:160. doi: [10.1186/1471-2148-9-160](https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-160) PMID: [19589156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19589156/)
45. Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol.* 2011; 27(3):111–4. doi: [10.1016/j.pt.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.001) PMID: [21215699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21215699/)
46. Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10(1):249–77. doi: [10.3390/ijerph10010249](https://doi.org/10.3390/ijerph10010249) PMID: [23343982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23343982/)
47. Aliota MT, Peinado SA, Osorio JE, Bartholomay LC. *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* mosquito susceptibility to Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(10) [Epub ahead of print].
48. Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda R, Fernandes RS, Campos SS, da Silva KA et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016 E-pub: 22 Jul 2016. doi: [10.1590/0074-02760160332](https://doi.org/10.1590/0074-02760160332)
49. Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G et al. Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis* pii: jiw302. [Epub ahead of print]

3.2 Artigo 2.: *Culex quinquefasciatus* from areas reporting the highest incidence of microcephaly associated to Zika virus infections, Northeastern Brazil, are refractory to the virus.

Referência Bibliográfica

Rosilainy Surubi Fernandes, Stéphanie Silva Campos, Paulino Siqueira Ribeiro, Lidiane M. S. Raphael, Myrna C. Bonaldo, Ricardo Lourenço-de-Oliveira.

Situação do Manuscrito: Aceito para publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Resumo: O vírus Zika (ZIKV) é amplamente distribuído no Brasil, sendo a região Nordeste (NE) a zona mais afetada com maior incidência de microcefalia associada a infecções congênitas de ZIKV. Relatamos tentativas de infectar três populações de *Cx. quinquefasciatus* de regiões severamente afetadas das regiões NE e Sudeste (SE) do Brasil com três cepas de ZIKV isoladas dessas localidades. Utilizamos *Ae. aegypti* de SE, como controle positivo. Todos *Cx. quinquefasciatus* testados foram refratários aos isolados de ZIKV. Ainda não há razão para considerar *Cx. quinquefasciatus* como um potencial vetor de ZIKV no Brasil.

3.2 ARTIGO 2.

1 **DISCLAIMER**

2 This paper was submitted to the *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* on 13 April 2017
3 and was posted to the Fast Track site on 17 April 2017. The information herein is
4 available for unrestricted use, distribution and reproduction provided that the original
5 work is properly cited as indicated by the Creative Commons Attribution licence (CC
6 BY).
7

8 **RECOMMENDED CITATION**

9 Fernandes RS, Campos SS, Ribeiro PS, Raphael LMS, Bonaldo MC, Lourenço-de-
10 Oliveira R. *Culex quinquefasciatus* from areas reporting the highest incidence of
11 microcephaly associated to Zika virus infections, northeastern Brazil, are refractory to
12 the virus [Submitted]. Mem Inst Oswaldo Cruz E-pub: 17 Ap 2017. doi: 10.1590/0074-
13 02760170145.
14

15 16 **Cx. quinquefasciatus and Zika virus** 17

18 ***Culex quinquefasciatus* from areas reporting the highest incidence of microcephaly**
19 **associated to Zika virus infections, Northeastern Brazil, are refractory to the virus**
20

21 Rosilainy Surubi Fernandes¹ Stéphanie Silva Campos¹ Paulino Siqueira Ribeiro¹
22 Lidiane M. S. Raphael², Myrna C. Bonaldo² Ricardo Lourenço-de-Oliveira¹⁺
23
24

25 ¹ Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz,
26 Rio de Janeiro RJ, Brasil.

27 ² Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio
28 de Janeiro RJ, Brasil.
29
30

31 **Abstract**

32

33 Zika virus (ZIKV) is widely distributed in Brazil, with the Northeastern region (NE) the
34 most affected zone with the highest incidence of microcephaly associated with ZIKV
35 congenital infections. We report attempts to infect three populations of *Cx.*
36 *quinquefasciatus* from severely affected sites from NE and Southeast (SE) regions of
37 Brazil with three strains of ZIKV isolated from these localities. An *Ae. aegypti*
38 population from SE, was used as a positive control. All tested *Cx. quinquefasciatus*
39 populations were refractory to the ZIKV isolates. There is still no reason to consider
40 *Cx. quinquefasciatus* as a potential vector of ZIKV in Brazil.

41 **Key words:** *Culex quinquefasciatus*, Zika virus, vector competence, Brazil.

42 [†]Corresponding author. Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Instituto Oswaldo Cruz, Av.
43 Brasil 4365, Manguinhos, CEP: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel (21)
44 25621237. E-mail: lourenco@ioc.fiocruz.br

45 **Financial support:** CAPES-COFECUB Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
46 de Nível Superior (grant n. 799/14), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à
47 Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (grants n. E-26/102.351/2013 and E-
48 26/201.335/2016), Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant
49 n. 309577/2013-6), National Institut of Health (grant n. 1U01 AI115595-01). The
50 funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or
51 preparation of the manuscript, European Union's Horizon 2020 research and innovation
52 programme (ZIKAlliance grant agreement no. 734548).

53

54 After a rapid expansion in the Pacific region, Zika virus (ZIKV) was first
55 recognized in Northeastern Brazil in 2015, followed by a countrywide epidemic that
56 eventually spread to the entire continent (Zanluca et al. 2015, Possas et al. 2017). In
57 2016, 15,319 probable Zika cases were recorded in Brazil, and the Northeast (NE)
58 region was the most affected zone, with the highest incidence (134.4/100,000
59 inhabitants) ([http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-inisterio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico#numerosrecentes)
60 [inisterio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico#numerosrecentes](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-inisterio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico#numerosrecentes)). Moreover,
61 it was in this Brazilian region where the first cases of microcephaly associated with
62 ZIKV infection were reported, as well as having the highest incidence of this condition
63 and other congenital neurological malformations worldwide. Indeed, 76.2% of the 2,366
64 confirmed cases of ZIKV-associated microcephaly recorded in Brazil in 2015-2016
65 occurred in this region of the country (Possas et al. 2017).

66 The primary vector of ZKV is *Aedes aegypti* (Weger-Lucarelli et al. 2016,
67 Ferreira-de-Brito et al. 2016). However, due to its great abundance and anthropophilic
68 behavior in epidemic areas, especially in low income districts where microcephaly was
69 highest, *Culex quinquefasciatus* came under suspicion to be an alternative ZIKV vector.
70 So, it was mandatory to investigate the ability of this species in terms of vector
71 competence since it could be essential to ZIKV control. To date, experimental data with
72 regard to *Cx. quinquefasciatus* vector competence for ZIKV has been somewhat
73 contradictory. For instance, Guo et al. 2016 reported the detection of ZIKV RNA in
74 saliva of orally infected Chinese *Cx. quinquefasciatus* and claimed this species to be a
75 potential vector. In contrast, *Cx. quinquefasciatus* from Rio de Janeiro, Brazil, was
76 shown to be unable to transmit local ZIKV isolates (Fernandes et al. 2016), a result also
77 observed for United State of America and Australian populations exposed to several

78 ZIKV strains (Weger-Lucarelli et al. 2016, Hall-Mendelin et al. 2016, Hart et al. 2017).
79 As vector competence is known to be geographically variable and depends on the
80 specific combination of mosquito and virus genotypes (Lambrechts 2011, Tabachnick
81 2013), we challenged *Cx. quinquefasciatus* from two sites reporting high records of
82 microcephaly associated to ZIKV infections in NE Brazil with three Brazilian ZIKV
83 isolates from NE and Southeast (SE) regions.

84 We used F₁ generation of *Cx. quinquefasciatus* from NE, Brazil: Recife
85 (Pernambuco State-PE- 08°03'14"S 34°52'52"W) and Campina Grande (Paraíba State-
86 PB - 7°13'51"S 35°52'54"W). For comparison, we used two *Cx. quinquefasciatus*
87 populations from SE: Manguinhos (F₁) and Triagem (F_{>10}), districts of Rio de Janeiro,
88 whose low vector competence was previously determined for other ZIKV isolates
89 (Fernandes et al. 2016), as well as an *Ae. aegypti* colony from Urca, Rio de Janeiro
90 (F_{>10}), which was previously shown to be a highly competent vector (Fernandes et al.
91 2016).

92 Mosquito rearing was approved by the Institutional Ethics Committee on Animal
93 Use (CEUA-IOC license LW-34/14) at the Instituto Oswaldo Cruz. No specific permits
94 were required for performing mosquito collection in the districts in Recife, Campina
95 Grande and Rio de Janeiro.

96 All used ZIKV strains belong to the Asian lineage and were previously isolated
97 from humans: ZIKVPE243 from the city of Recife, Pernambuco State, NE, Brazil
98 (Donald et al. 2016), ZIKVSPH2015 from the city of Sumaré, São Paulo State, SE,
99 Brazil (Faria et al. 2016), and ZIKV RioU-1 from Rio de Janeiro, SE, Brazil (Bonaldo
100 et al. 2016). ZIKVSPH2015 has a high level of similarity with ZIKVPE243 (99.9% of
101 nucleotides and 99.97% of amino acids) (Donald et al. 2016).

102 Female mosquitoes at 5-7 days post-emergence were fed with a mixture
103 containing two parts of washed erythrocytes and one part of viral suspension through an
104 artificial feeding apparatus. Depending on the availability, mosquitoes were examined
105 on days 7, 14 and 21 post oral challenge (dpi). Homogenates of body (thorax +
106 abdomen), and head were examined by plaque assays in culture of Vero cells for
107 determining infection (IR) and dissemination rates (DR) and for *Culex* body sample we
108 apply the real-time PCR reactions (RT-qPCR) technique to confirm positivity (for
109 details see Fernandes et al. 2016). Saliva was also collected for examination if there
110 were evidences of viral dissemination.

111 All tested *Cx. quinquefasciatus* were refractory to ZIKV regardless the viral
112 strain (Table I). The body of only one out of 20 *Cx. quinquefasciatus* from Recife
113 challenged with the ZIKVRioU1 was positive at 7 dpi, although the virus did not
114 disseminate in this individual, as evidence by the head repeatedly testing negative. As
115 the virus did not disseminate in any *Cx. quinquefasciatus*, saliva was not examined.

116 In contrast, all strains of ZIKV infected and disseminated in all *Ae. aegypti*
117 populations, regardless the geographical origin of the isolates. Infection rates in *Ae.*
118 *aegypti* ranged from 65% to 75% at 7 dpi and from 68% to 100% at 14 dpi; DR ranged
119 from 86% to 100% at 14 dpi. This *Ae. aegypti* population (Urca) has previously
120 exhibited high transmission rates (saliva infection) to two local ZIKV(Fernandes et al.
121 2016), and thus saliva of infected individuals were not exanimated here.

122 This is the first time that populations of *Cx. quinquefasciatus* from an area with
123 high incidence of microcephaly and other congenital malformations associated with
124 ZIKV infections, have been tested for vector competence to ZIKV from the same
125 region. In agreement with results using SE Brazilian populations of *Cx.*

126 *quinquefasciatus*, they are incompetent to transmit the virus, including a strain isolated
127 from the same epidemiological region. Our results of refractoriness to ZIKV are
128 consistent with studies on this and other members of the *Culex pipiens* Complex
129 (Fernandes et al. 2016, Weger-Lucarelli et al. 2016, Hall-Mendelin et al. 2016, Amraoui
130 et al. 2016, Hart et al. 2017). The only exception is Guo et al. (2016) who reported the
131 detection of ZIKV RNA in body and saliva of orally challenged Chinese *Cx.*
132 *quinquefasciatus* mosquitos. Detection of residual RNA, crossing reactions and cross-
133 contamination with positive control material, or other problems with molecular assays
134 without adequate negative controls may explain this isolated discrepant result. Indeed,
135 *Cx. quinquefasciatus* from several geographical origins and epidemiological situations
136 has consistently shown to be refractory to ZIKV for both the African and Asian
137 genotypes, even when challenged with blood meals with high viral titers (Fernandes et
138 al. 2016, Hall-Mendelin et al. 2016, Hart et al. 2017).

139 Evidence from the current study and from previously published works, thus
140 reinforce the conclusion that there is still no reason to consider *Cx. quinquefasciatus* as
141 a potential vector of ZIKV. Even when the mosquito and ZIKV isolates are from
142 localities with high incidence of human cases of Zika, *Cx. quiquefasciatus* is still an
143 incompetent laboratory vector.

144
145

146 **List of abbreviations**

147 NE: Northeast region

148 SE: Southeast region

149 dpi: days post oral challenge

150 IR: Infection Rate

151 DR: Dissemination rate

152 RT-qPCR: quantitative real-time polymerase chain reaction

153 **Authors' contributions**

154 RSF and RLO conceived the study and wrote the manuscript. RSF and SSC carried out
155 mosquito experimental infections and tested mosquito samples. LMSR and MCB
156 produced the viral stocks and plaque assays for ZIKV titration. RPS performed
157 mosquito collection and rearing in Recife and Campina Grande. All authors read and
158 approved the final manuscript.

159 **Acknowledgments**

160 The authors thank Iule de Souza Bonelly, Rafaella Moraes de Miranda, Keli Antunes
161 Barbosa da Silva and Anielly Ferreira-de-Brito for technical support. To Maria Ignêz
162 Bersot for rearing some of the tested mosquito populations, and to Pedro Fernando da
163 Costa Vasconcelos, Luciano Moreira and Marli T. Cordeiro for providing virus isolates.
164 To Maria Goreti Rosa-Freitas and Jeffrey Powell for correcting the manuscript.

165 **References**

166 Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M,
167 Failloux AB. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. Euro
168 Surveill. 2016; 21(35): 1-4.

169 Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Santos AAC, Menezes LS R, Cruz SOD et al.
170 Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. PLoS Negl
171 Trop Dis. 2016; 10(6): 1–17.

172 Donald CL, Brennan B, Cumberworth SL, Rezelj V, Clark JJ, Cordeiro MT, et al. Full
173 Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from
174 Recife, Brazil. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of
175 Zika Virus from Recife, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(10): 1–20.

176 Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al.
177 Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. Science. 2016;
178 352(6283): 1-10.

179 Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda MR, Silva KAB, Gonçalves
180 MC, et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit
181 the Local Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(9): 1-13.

182 Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda RM, Fernandes RS, Campos SS, Silva KAB.
183 First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and
184 throughout South America. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2016; 111(10):
185 655-658.

186 Guo X, Li C, Deng Y, Xing D, Liu Q, Wu Q. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a
187 potential vector to transmit Zika virus. Emerging microbes & infections 2016; 5(9):1-5.

188 Hall-Mendelin S, Pyke AT, Moore PR, Mackay IM, McMahon JL, Ritchie SA et al.
189 Assessment of Local Mosquito Species Incriminates *Aedes aegypti* as the Potential
190 Vector of Zika Virus in Australia. PLoS Negl Trop 2016; 10(9): 1-14.

191 Hart CE, Roundy, CMSRA, Huang JH, Yun R, Reynolds et al. Zika Virus Vector
192 Competency of Mosquitoes, Gulf Coast, United States. Emerg Infect Dis 2017; 23(3):
193 559-560.

194 Lambrechts, L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue
195 viruses: Towards a new paradigm? Trends in Parasitology 2011; 27(3): 111–114.

196 Possas C, Brasil P, Marzochi MCA, Tanuri A, Martins R, Marques ETA et al. Zika
197 puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A Review.
198 Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017; 113: *in press*.

199 Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito
200 arbovirus transmission competence. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(1): 249-
201 77.

202 Weger-Lucarelli J, Ručkert C, Chotiwan N, Nguyen C, Luna SMG, Fauver JR, Foy
203 BD, Perera R, Black W C, Kading RC, Ebel GD. Vector Competence of American
204 Mosquitoes for Three strains of Zika Virus. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016;
205 10(10): 1-16.

206 Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K.
207 First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo
208 Cruz. 2015; 110(4): 569–72.

209

210

Table 1. Infection (IR) and dissemination rates (DIR) of Brazilian *Culex quinquefasciatus* challenged with three ZIKV isolates.

Virus isolate/Origin/ Titer (PFU/ml)	Mosquito Population	Days after exposure	Number examined per time point	IR per time point	DIR per time point
	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Recife, NE (F1)	7,14	20,20	0,0	--
ZIKVPE243	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Campina Grande, NE (F1)	7,14	20,20	0,0	--
Recife, NE,	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Rio de Janeiro, SE (>F10)	7,14	30,30	0,0	--
2015	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Rio de Janeiro, SE (F1)	7,14	30,30	0,0	--
2.3x10 ⁶	<i>Ae. aegypti</i> Rio de Janeiro (>F10)	7,14	20,39	65%, 68%	30%, 86%
	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Recife, NE (F1)	7,14	12,20	0,0	--
ZIKVSPH	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Campina Grande, NE (F1)	7,14	20,20	0,0	--
Sumaré, SE,	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Rio de Janeiro, SE (>F10)	14,21	30,3	0,0	--
2015	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Rio de Janeiro, SE (F1)	14,21	30,8	0,0	--
1.68x10 ⁷	<i>Ae. aegypti</i> Rio de Janeiro (>F10)	14	20	100%	100%
	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Recife, NE (F1)	7,14	20,20	5%, 0%	0%, 0%
ZIKVU1	<i>Cx. quinquefasciatus</i> Campina Grande, NE (F1)	7,14	20,20	0,0	--
Rio de Janeiro,	<i>Ae. aegypti</i> Rio de Janeiro (>F10)	7	20	75%	60%
SE, 2015					
3.55x10 ⁶					

212 DIR: Dissemination Rate refers to the proportion of mosquitoes with infected head among the infected mosquitoes;

213 IR: Infection Rate refers to the proportion of mosquitoes with an infected body (abdomen/thorax) among tested

214 mosquitoes; NE: Northeast region; SE: Southeast region.

215

3.3 Artigo 3.: Susceptibilidade de *Aedes aegypti* desafiados com diferentes diluições do vírus Zika isolado no Espírito Santo, ES.

Referência Bibliográfica:

Rosilainy Surubi Fernandes, Filipe Vieira Santos de Abreu, Keli Antunes Barbosa da Silva, Noemi Rovaris Gardinali, Marcelo Pinto, Ricardo Lourenço-de-Oliveira

Situação do Manuscrito: Em preparação para submissão.

Resumo: O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus da família Flaviridae do gênero *Flavivirus*, e tem como principal vetor mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, que possuem hábito alimentar antropofílico. No Brasil houve grande surto de Zika em muitos estados, a partir de 2015, causando uma grande epidemia em 2016, principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro Oeste. Como ainda não existe uma vacina contra o ZIKV, são necessários estudos que busquem compreender a dinâmica da transmissão para melhor definir as estratégias de controle vetorial. Dessa forma, este trabalho visou avaliar a competência vetorial de mosquitos *Ae. aegypti* através de duas formas de infecção oral: (1) diretamente sobre hospedeiro, aqui representado por macacos rhesus (*Macaca mulatta*) infectados com isolados de ZIKV do Espírito Santo; (2) através de alimentador artificial, contendo a mesma cepa de ZIKV, porém com diferentes doses do vírus (10^8 , 10^7 e 10^6 PFU/mL). A taxa de infecção dos mosquitos foi baixa nas menores concentrações quando tomaram repasto com baixa carga viral, independente do modo de alimentação. Em contraste, na alimentação artificial contendo as duas maiores concentrações virais, os mosquitos apresentaram alta taxa de infecção. Esses resultados podem indicar importantes limiares de carga viral no repasto necessárias para que os mosquitos possam se infectar.

3.3 ARTIGO 3.

Sobre a infectividade experimental oral do vírus Zika para o mosquito *Aedes aegypti* dependendo da dose e tipo de alimentação

Rosilainy Surubi Fernandes, Filipe Vieira Santos de Abreu, Keli Antunes Barbosa da Silva, Noemi Rovaris Gardinali, Marcelo Pinto, Ricardo Lourenço-de-Oliveira

Resumo

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus da família Flaviridae do gênero *Flavivirus*, e tem como principal vetor mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, que possuem hábito alimentar antropofílico. No Brasil houve grande surto de Zika em muitos estados, a partir de 2015, causando uma grande epidemia em 2016, principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro Oeste. Como ainda não existe uma vacina contra o ZIKV, são necessários estudos que busquem compreender melhor a dinâmica da transmissão para se melhor definir as estratégias de controle vetorial. Dessa forma, este trabalho visou a avaliar a competência vetorial de mosquitos *Ae. aegypti* através de duas formas de infecção oral: (1) diretamente sobre hospedeiro, aqui representado por macacos rhesus (*Macaca mulatta*) infectadas com cepa de ZIKV do Espírito Santo; (2) através de alimentador artificial, contendo a mesma cepa de ZIKV, porém com diferentes doses do vírus (10^8 , 10^7 e 10^6 PFU/mL). A taxa de infecção dos mosquitos foi baixa nas menores concentrações quando tomaram repasto com baixa carga viral, independente do modo de alimentação. Em contraste, na alimentação artificial contendo as duas maiores concentrações virais, os mosquitos apresentaram alta taxa de infecção. Esses resultados podem indicar importantes limiares de carga viral no repasto necessárias para que os mosquitos possam se infectar.

Palavras-chave: Zika, *Aedes aegypti*, macacos rhesus, taxa de infecção.

Introdução

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947 na Floresta de Zika em Uganda, a partir de macacos Rhesus usados como sentinelas (Dick *et al.*, 1952). O ciclo de transmissão silvestre do ZIKV envolve primatas não-humanos e mosquitos silvestres acrodendrofílicos. De mosquitos silvestres, o vírus foi primeiramente isolado de lotes de *Aedes africanus*, no ano de 1948, em Uganda (Dick *et al.*, 1952). O genoma de ZIKV já foi detectado em espécies de mosquitos pertencentes a diversos gêneros, em especial no ambiente selvagem ou em área peri-urbana (Diallo *et al.*, 2014, Grard *et al.* 2014). Contudo fora da África, o vírus foi detectado em *Ae. aegypti* em epidemias em meio urbano, na Malásia, em 1969 (Marchette, Garcia e Rudnick, 1969), no Brasil e México, em 2015 (Ferreira-de-Brito *et al.*, 2016, Guerbois *et*

al., 2016). Estes últimos achados somados à competência vetorial para diferentes cepas de ZIKV demonstradas por populações americanas (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016; Dutra *et al.*, 2016, Fernandes *et al.*, 2016) indicam *Ae. aegypti* como vetor primário de ZIKV no Brasil e outros países da América tropical e subtropical.

Depois de uma epidemia de Zika em 2007 na ilha do Pacífico Ocidental do Yap, nos Estados Federados da Micronésia (Duffy *et al.*, 2009), uma grande epidemia foi registrada na Polinésia Francesa, no Sul do Pacífico, em 2013 e 2014 (Cao-Lormeau *et al.*, 2014). Em 2015, os primeiros casos de ZIKV foram registrados no Brasil, no estado da Bahia (Campos *et al.*, 2015) e Rio Grande do Norte (Zanluca *et al.*, 2015). Aparentemente, a epidemia se disseminou a partir do Nordeste, atingindo principalmente as regiões Centro Oeste e Sudeste do país (Brasil, 2016). A atenção à recente epidemia foi redobrada com a associação da infecção por ZIKV com casos de microcefalia (Possas *et al.*, 2017, Calvet *et al.*, 2016, Martines *et al.*, 2016, Cugola *et al.*, 2016) e Síndrome de Guillain-Barré (Brasil *et al.*, 2016). No entanto, o conhecimento sobre vários aspectos e sobre a transmissão de ZIKV e a sua patogenia para os vertebrados é ainda insipiente.

Estudos sobre modelos animais são essenciais para o entendimento da patogênese por ZIKV, bem como para a avaliação de vacinas candidatas e terapêutica. Antes da epidemia atual, o resultado da infecção por ZIKV no modelo macaco rhesus (*Macaca mulata*) não tinha sido bem caracterizado. Entretanto, o fato de o vírus ter sido isolado originalmente de macacos rhesus sugere que a replicação viral, resposta imune e aspectos e patogênese podem ser estudados neste modelo (Hirsch *et al.*, 2017).

Alguns experimentos com desafio oral de distintas populações de *Ae. aegypti* com diferentes cepas de ZIKV mostraram grande heterogeneidade quanto susceptibilidade ao vírus (Wong *et al.* 2013, Chouin-Carneiro *et al.*, 2016, Weger-Lucarelli *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2016; Hall-Mendelin *et al.*, 2016; Richard *et al.*, 2016; Ciota *et al.*, 2017; Rather *et al.*, 2017, Liu *et al.*, 2017; Roundy *et al.*, 2017, Costa-da-Silva *et al.*, 2017). Sabe-se que a infecção de mosquitos e a transmissão do vírus juntamente com sua saliva depende de interação genótipo viral x genótipo do mosquito x condições ambientais (Lambrechts, 2009; Lambrechts, 2011). Além da genética do vírus, sabe-se que a carga viral no sangue virêmico influencia a competência vetorial (Pongsiri *et al.*, 2014; Richards *et al.*, 2012).

Este trabalho visa a analisar a infectividade do ZIKV para mosquitos *Ae. aegypti* desafiados, por via oral, diretamente sobre macacos-rhesus virêmicos ou em sistema

artificial contendo repastos sanguíneos, em ambos os casos apresentando diferentes concentrações do vírus Zika.

Material e Métodos

Macacas rhesus e infecção com ZIKV

Esta metodologia faz parte do projeto de pesquisa sobre o Monitoramento laboratorial da infecção por vírus Zika vírus no modelo experimental *Macaca mulatta*, realizado pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia e coordenado pelo Dr. Marcelo Pinto.

Duas macacas rhesus, denominadas de AB68 e AD14, com respectivamente 11 e 9 anos de idade e com 76 e 49 dias de gravidez, foram infectadas através da injeção de 1 mL de sobrenadante de cultura de células vero contendo ZIKV isolado a partir de um caso humano da cidade de Vitória, Espírito Santo, ES (Barreto-Vieira *et al.*, 2016), com título viral de $2,6 \times 10^8$ pfu/mL. O inóculo foi administrado na pele glabra do abdômen, pela via subcutânea (Marcelo Pinto, informação pessoal). As macacas alojadas em infectório NB2 e acompanhadas diariamente. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC), número LW-8/16.

Mosquitos Ae. aegypti

Empregado uma colônia de *Ae. aegypti* oriunda do bairro de Manguinhos, Rio de Janeiro, mantida por mais de 10 gerações no laboratório. Os ovos e as larvas foram incubados em insetário com umidade, temperatura e foto-período controlados ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR, ciclo de 12h de luz e 12h de escuro). Larvas foram criadas em recipiente (medindo 30x21x6 cm) contendo 1 litro de água de torneira desclorada, com aproximadamente 100 larvas cada, e alimentadas com levedura de cerveja (Fernandes *et al.* 2016). Os adultos foram mantidos sob as mesmas condições controladas acima descritas, e suplementadas com uma solução de sacarose a 10% *ad libitum*.

Repasto sanguíneo em macacas rhesus

Fêmeas de *Ae. aegypti* com cinco a sete dias pós-emergência foram colocadas em gaiolas, em número entre 80 a 100 fêmeas em cada. As gaiolas de plástico consistem em um recipiente cilíndrico adaptado, onde a parte superior é coberta com um tecido (*voil*), ao passo que a parte inferior apresenta uma rodela de espuma

sintética (espuma vinílica acetinada - EVA) que possibilita mobilidade no momento do repasto sanguíneo, para diminuir o espaço entre os mosquitos e a parte superior da gaiola.

Distintos lotes de mosquitos (entre 80 a 100 mosquitos por lote) foram alimentados diretamente nas macacas nos dias 2, 4, 8, 12, 18, 25, 35, 43, 70 e 108 pós-infecção dos primatas. As gaiolas foram colocadas diretamente em contato com a epiderme das macacas, na porção inferior do ventre. O tempo de repasto foi de 20 minutos e, sobre cada macaca, foi colocada uma gaiola por dia de alimentação. Após o repasto sanguíneo, somente os mosquitos totalmente ingurgitados eram aproveitados após triagem em banho de gelo. Posteriormente foram transferidas para gaiolas de papelão, eram incubadas em uma B.O.D com temperatura, umidade e foto-período controlados (26°C; 80%UR e com ciclo de 12h de luz e 12h de escuro). Após 3, 7 e 14 da alimentação infectante (dpi), lotes de 20 mosquitos de cada dpi foram examinados para a determinação das taxas relativas à competência vetorial, conforme detalhado por Fernandes *et al.* (2016) e detalhado mais à frente.

A taxa de infecção, determinada a partir de triturado de tecidos do abdome + tórax (corpo), corresponde ao percentual de indivíduos infectados dentre o número de indivíduos desafiados oralmente. A taxa de disseminação, determinada a partir de triturados da cabeça dos insetos, corresponde ao percentual de mosquitos positivos nestes tecidos dentre aqueles que tinham o corpo positivo. Por último, a taxa de transmissão corresponde à proporção de indivíduos com a saliva positiva dentre aqueles em que o vírus foi capaz de disseminar (Vega-Rúa *et al.*, 2014).

Repasto Sanguíneo através de alimentação artificial

Entre 60-70 fêmeas de *Aedes aegypti*, da mesma colônia e idade pós-emergência, foram triadas, manipuladas e alimentadas com repasto contendo ZIKV, porém empregando-se alimentador artificial. Assim, os mosquitos foram alimentados com uma mistura de eritrócitos de coelho, fago-estimulante (ATP 0,5 mM) e suspensão viral da mesma cepa de ZIKV inoculada nas macacas-rhesus descrita acima. Foram usadas três cargas virais. Como o exame do soro da macaca que apresentou mais elevada carga viral no pico da viremia (macaca AB68) tinha aproximadamente 1×10^8 cópias de RNA de ZIKV/mL, desafiemos os mosquitos através do alimentador artificial contendo sangue juntamente com diluições do sobrenadante de cultura originalmente inoculado nos animais, nas concentrações finais de 10^8 , 10^7 e 10^6 pfu/mL. As fêmeas

foram alimentadas através de uma membrana (intestino de porco) que cobria a base de alimentadores de vidro contendo a mistura supracitada mantida a 37°C (banho-maria). Cada alimentador recebeu uma das três diluições. O repasto de mosquitos foi limitado a 60 minutos. Igualmente o descrito para os mosquitos alimentadas diretamente sobre as macacas, apenas fêmeas inteiramente ingurgitadas foram incubadas a 26°C em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo constantes (70 ± 10% UR e com ciclo de 12h de luz e 12h de escuro) com acesso diário a 10% de solução açucarada. As amostras de 20 mosquitos de cada população foram examinadas aos 7 e 14 dias após a exposição ao vírus.

Salivação forçada

Para a técnica de salivação forçada, 20 mosquitos foram anestesiados em gelo e transferidos para uma placa de Petri de vidro, onde as asas e as pernas de cada um foram removidas. A probóscide foi inserida suavemente numa ponteira de 10uL contendo um 5 µL de soro bovino fetal (SFB) estéril, e assim permanecendo durante 30 minutos. Após, a saliva no soro foi transferida para um microtubo contendo 45 µL de meio Leibovitz e posteriormente armazenada em freezer -80°C. Abdômen e cabeça foram separados e inseridos em microtubos contendo pérolas de vidro (mini-beads) de 1 mm, e meio Leibovitz contendo 4% de SFB, onde foram triturados para inoculação em cultura de células Vero.

Detecção viral

Para a determinação das taxas de infecção e disseminação viral, cada corpo e cabeça já triturados foram centrifugados a 10.000 x g durante 5 min a 4°C antes de sua inoculação. Os homogenatos de corpo e cabeça foram individualmente diluídos em série (1/10, 1/100 e 1/1000, em meio Earle's 199, contendo 5% de SFB, gentamicina e fungizona, ambos 100 microlitros/100mL, e penicilina 1ml/100ml) e inoculados em monocamadas de células Vero em placas de 96 poços. Após 1h de incubação a 37°C, foram adicionados 150 µL de CMC (carboximetilcelulose) a 2,4% em meio Earle's 199 (contendo 5% de SFB, gentamicina e fungizona, ambos 100 microlitros/100mL, e penicilina 1ml/100mL) por poço. Após 7 dias de incubação a 37°C, as células foram fixadas com formaldeído a 10%, lavadas e coradas com 0,4% de cristal violeta. A presença das partículas virais foi avaliada por detecção de placas virais (PFU). A susceptibilidade foi avaliada através da taxa de infecção que refere-se à proporção de mosquitos com o corpo infectado (abdômen e Tórax) entre os mosquitos testados.

Resultados

As macacas rhesus AD14 e AB68 apresentaram pico de viremia no segundo dia após a inoculação. A carga viral estimada em amostra de soro coletada neste tempo pós-inoculação foi de, respectivamente, $8,01 \times 10^7$ e $2,9 \times 10^8$ cópias de RNA de ZIKV/mL, segundo análise por qRT-PCR (Marcelo Pinto, informação pessoal). Não foi determinada a carga viral em amostra de sangue total nos animais.

As taxas de infecção dos mosquitos alimentados diretamente nas macacas com 2, 4, 8, 12, 18, 25, 35 dpi foram muito baixas ou nulas. Assim, somente mosquitos alimentados no 2º. dpi na macaca AB68 foram positivos, representando 5% e 15% dos mosquitos examinados ao 3º e 7º. dias após alimentação sobre esse primata (Figura 1). Todos os mosquitos alimentados na macaca AD14 foram negativos, independentemente do período pós-inoculação do primata.

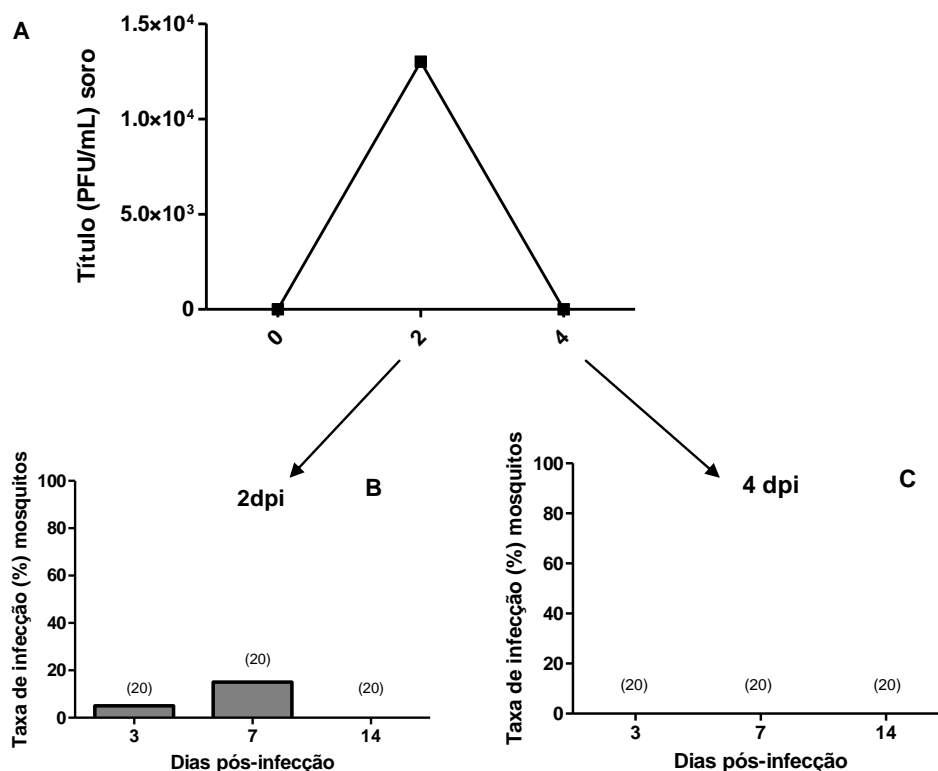


Figura 1. Taxa de infecção de mosquitos *Aedes aegypti* quando expostos ao sangue infectado com cepa de Zika do Espírito Santo, ES. A. Título de amostra de soro da macaca rhesus (*Macaca mulatta*) AB68 com 2 e 4 dias de infecção. B. Taxa de infecção de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados com sangue da macaca AB68 após dois dias de infecção. C. Taxa de infecção mosquitos *Aedes aegypti* alimentados com sangue da macaca AB68 após quatro dias de infecção.

O experimento com infecção oral realizado em alimentador artificial apresentou elevadas taxas de infecção dos mosquitos examinados com 7 dpi. Entre os mosquitos

alimentados com repasto sanguíneo contendo concentração 10^8 pfu/mL, 90% foram positivos. Quando tomaram repastos contendo 10^7 e 10^6 pfu/mL, as taxas de infecção foram bem mais baixas (30 e 10% respectivamente) (Figura 2). Já com 14 dpi, os mosquitos exibiram elevadas taxa de infecção quando ingeriram concentrações de 10^8 e 10^7 pfu/mL (100 e 70%, respectivamente), ao passo que a ingestão de carga viral na concentração de 10^6 pfu/mL resultou em taxa de infecção consideravelmente baixa (15%).

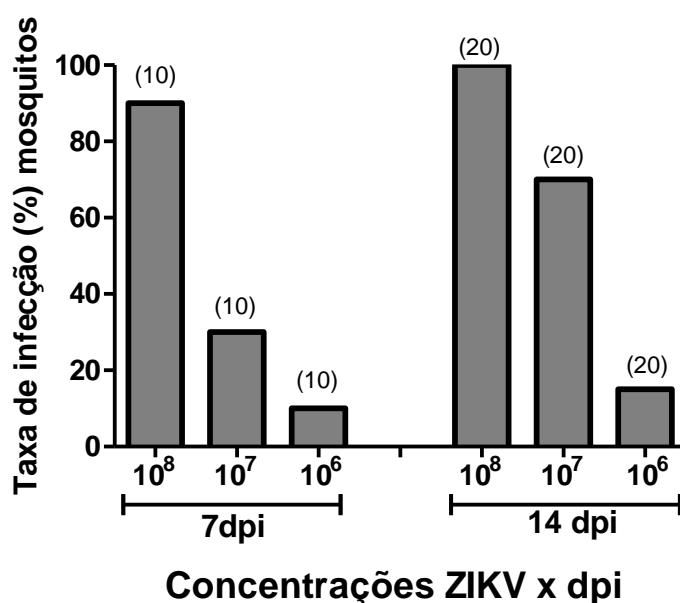


Figura 2. Taxa de infecção com 7 e 14 dias de infecção de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados artificialmente com sangue infectado com diferentes concentrações da cepa de ZIKV do Espírito Santo, ES.

Embora a carga viral do soro da macaca AB68 estivesse elevada no 2º dpi, segundo técnica de qRT-PCR ($2,9 \times 10^8$ cópias de RNA de ZIKV/mL), verificamos que o título viral de amostras do mesmo soro examinado por essa técnica molecular estava entre $5,75 \times 10^4$ e $1,3 \times 10^4$ pfu/mL. Não foi observada presença de plaque nas amostras de soro de ambas as macacas no 4º dia após inoculação do vírus nos primatas, ou seja, a partir do quarto dia de infecção nenhuma partícula infecciosa de ZIKV foi detectada no soro.

Discussão

Os modelos de infecção que utilizam primatas não-humanos são importantes, pois, em teoria, a infecção e patogenia nesses animais mais se aproximam das condições em humanos. A infecção experimental das macacas usadas como fonte sanguínea para os mosquitos tinha como objetivo estudar a gênese da microcefalia associada ao ZIKV (Marcelo Pinto, informação pessoal). A curva da viremia nos dois animais revelou um pico no 2º. dpi, seguido de queda brusca do 4º dpi em diante. Não houve coleta e exame do sangue das macacas no 3º. Ou seja, neste modelo animal a viremia foi aparentemente curta e baixa, mesmo durante o pico virêmico, insuficiente para infectar mosquitos de uma população de laboratório que se mostrou capaz de se infectar com a mesma cepa viral, porém com títulos mais elevados no repasto tomado em alimentador artificial. Com efeito, não obtivemos sucesso na infecção dos mosquitos que realizaram hematofagia diretamente sobre dois macacos-rhesus infectados com suspensão viral de ZIKV, independentemente do dia pós-inoculação e do título viral em que os insetos foram desafiados oralmente.

Observou-se grande discrepância entre os títulos virais determinados por número de cópias de RNA de ZIKV/mL e Pfu/mL no soro do animais no pico de viremia (2 dpi). Essa diferença pode ser resultado da uma alta produção de partículas não infecciosas ou defectivas, que são detectadas na técnica de qRT-PCR, mas não nos ensaios de formação de placas de lise. Bae *et al.* (2003), afirmam que a técnica de RT-qPCR não pode substituir o padrão ouro, o ensaio de formação de placas de lise, pelo fato de que detecta apenas moléculas do genoma viral e não características biológicas, como o potencial infeccioso da partícula viral. Assim, uma suposição para a baixa taxa de infecção nos mosquitos seria de que o número de partículas virais infectantes no sangue ingerido estivesse muito abaixo do necessário para que a infecção se estabeleça em vetores. Assim, possivelmente, concentrações entre 10^3 e 10^4 pfu/mL não são suficientes para que ocorra infecção de mosquitos com ZIKV.

Resultado semelhante foi demonstrado nos experimentos de Roundy *et al.* (2017), quando desafiaram oralmente mosquitos *Ae. aegypti* de Salvador, Bahia, com três cepas de ZIKV de diferentes genótipos (Africano, Asiático e Americano) e em diferentes concentrações (\log_{10} , 5 \log_{10} e 6 \log_{10}). Os autores observaram que mosquitos alimentados com a cepa de genótipo Asiático não apresentaram infecção quando ingeriram sangue na concentração 4 \log_{10} . Somente foi observada infecção em mosquitos de Salvador que ingeriram a diluição mais elevada para as cepas de genótipo Asiático (6 \log_{10}), mesmo genótipo usado no presente trabalho. Mais recentemente ainda, Ciota *et al.* (2017) encontraram correlação direta entre as taxas de

infecção de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e a dose viral no repasto tomado por estes mosquitos constituído por diferentes diluições de sobrenadantes de cultura de ZIKV de duas origens.

De fato, a carga viral ingerida pelos mosquitos no repasto infectante parece ter grande importância na instalação da infecção por diferentes arbovírus. Jupp (1974) verificou que uma redução nos títulos do vírus do Oeste do Nilo de 5,0 para 2,6 log no repasto tomado por *Culex univittatus* acarretava na diminuição das taxas de transmissão de 89% para 33%. Mitchell *et al.* (1992), observaram que quanto mais partículas infectantes do vírus da Encefalite Equina do Leste (EEE) fêmeas de *Ae. albopictus* conseguiam ingerir, maior era a taxa de infecção. Sardelis *et al.* (2002) descreveram taxas de infecção e transmissão bem mais elevadas em *Ae. japonicus* e *Ae. albopictus* alimentados em picos virêmicos com títulos mais altos do mesmo vírus da EEEV. Sardelis *et al.* (2003), alimentando *Ae. japonicus* e *Cx. pipiens* em frangos infectados com o vírus da Encefalite Saint Louis, observaram que as taxas de infecção variaram entre 0 e 33% na primeira e de 12 a 94% na segunda espécie ao ingerirem sangue contendo título entre $10^{4.1}$ e $10^{4.7}$ PFU/mL. Mas quando a viremia nos frangos era um pouco maior, ou seja, variou entre $10^{5.3}$ e $10^{5.6}$ PFU/mL, as taxas de infecção foram similares entre as duas espécies de mosquito: 96% and 100%, respectivamente.

No experimento de infecção artificial contendo três diluições nos repastos ingeridos por *Ae. aegypti* (10^8 , 10^7 e 10^6 pfu/mL), os mosquitos apresentaram elevadas taxas de infecção com 7 dpi na concentração de 10^8 pfu/mL de ZIKV. Com 14 dpi, nas concentrações mais elevadas, os mosquitos tiveram alta taxa de infecção, no entanto, a menor concentração (10^6) mostrou baixa infecção.

As diferenças entre susceptibilidades dos mosquitos avaliados em nosso experimento demonstraram que são necessárias mais pesquisas com diferentes populações de mosquitos *Ae. aegypti* desafiados com maior número de concentrações de suspensão viral, tanto em condições mais próximas do hospedeiro vertebrado, quanto em experimentos em condições de laboratório, para se conhecer melhor fatores que favorecem a transmissão vetorial do vírus Zika, como os limiares mínimos para a infecção dos mosquitos nas condições próximas às naturais.

Referências

Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a

case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653–60.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP et al. 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific. *Emerg Infect Dis* 2013;20:1085–1086.

Campos G, Bandeira A, Sardi S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1881.

Ciota AT, Bialosuknia SM, Zink SD, Brecher M, Ehrba D. Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerging Infection Diseases* 2017; 23(7). <https://dx.doi.org/10.3201/eid2307.161633>.

Chouin-carneiro T, Vega-rua A, Vazeille M, Yebakima A. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. 2016;1–11.

Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y et al. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*. 2014;13(10):e109442. doi: 10.1371/journal.pone.0109442. e Collection 2014.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952;46:509 –520.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009;360:2536 –2543.

Ferreira-De-Brito A, Ribeiro IP, Moraes De Miranda R, Fernandes RS, Campos SS, Antunes K, et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;1–4.

Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda R M, Silva ABK, Castro MG et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 10(9): e0004993.

Hall-Mendelin S, Pyke AT, Moore PR, Mackay IM, McMahon L, Ritchie SA, et al. Assessment of Local Mosquito Species Incriminates *Aedes aegypti* as the Potential Vector of Zika Virus in Australia. 2016;1–14.

Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, Broeckel RM, Parkins CJ, Kreklywich C, et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLOS Pathog* [Internet]. 2017;13(3):e1006219.

Jupp PG. Laboratory studies on the transmission of West Nile virus by *Culex* (*Culex*) *univittatus* Theobald; factors influencing the transmission rate. *J Med Entomol.* 1974 Aug;11(4):455-8.

Ministério da Saúde/ Secretaria de Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de Dengue, febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016.

Mitchell, C. J., M. L. Niebylski, G. C. Smith, N. Karabatsos, D. Martin, J.-P Mutebi, G. B. Craig, Jr. and M. J. Mahler. 1992. Isolation of eastern encephalitis virus from *Aedes albopictus* in Florida. *Science* 257: 526-527

Possas C, Brasil P, Marzochi MC, Tanuri A, Martins RM, Marques ET, et al. Zika puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2017;(ahead):0–0.

Richards, Stephanie L, Sheri L Anderson, Cynthia C Lord, Chelsea T Smartt, and Walter J Tabachnick. 2012. “Relationships between Infection, Dissemination, and Transmission of West Nile Virus RNA in *Culex Pipiens Quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).” *Journal of Medical Entomology* 49 (1): 132–42. doi:10.1603/ME10280.

Sardelis MR1, Dohm DJ, Pagac B, Andre RG, Turell MJ. Experimental transmission of eastern equine encephalitis virus by *Ochlerotatus j. japonicus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2002;39(3):480-4.

Sardelis MR1, Turell MJ, Andre RG. Experimental transmission of St. Louis encephalitis virus by *Ochlerotatus j. japonicus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2003 Jun;19(2):159-62.

Weger-lucarelli J, Chotiwan N, Nguyen C, Ru C, Luna MG, Fauver JR, et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. 2016;1–16.

Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(4):569–72.

4. DISCUSSÃO

A epidemia de zika no Brasil, iniciada em 2015, registrou grandes números de casos, primeiramente na região Nordeste, mas em seguida nos demais estados de outras regiões em um curto tempo. Desde então, o combate à doença foi ampliado e os números de casos de zika passaram a serem incluídos nos Boletins Epidemiológicos do Ministério da Saúde, que passou a publicar notas técnicas de cuidados na atenção domiciliar e protocolos de vigilância às manifestações mais graves da doença, a fim de tentar aumentar a eficácia no controle vetorial da epidemia.

Apesar de todos os esforços, a incidência de zika aumentou a partir de 2015, com o pico de casos suspeitos e confirmados no ano de 2016 e, em 2017, até o final do mês março, foram registrados 4.894 casos prováveis de febre pelo ZIKV, com uma taxa de incidência de 2,4 casos/100 mil habitantes (Brasil, 2017).

Entre todos os problemas ocasionados por este grande surto estão as complicações relacionadas à doença, como a “Síndrome Congênita do Zika”, que engloba casos de microcefalia e outras alterações do Sistema Nervoso Central (Diniz, 2016). O maior número de casos desta síndrome ocorreu na região Nordeste, atingindo 72% dos filhos de mulheres da Bahia, da Paraíba, de Pernambuco e do Rio Grande do Norte, com sinais indicativos de microcefalia (Diniz, 2016). Todavia, outras regiões do país também apresentaram elevados números de casos de Zika, com registros da síndrome, como é o caso da região Sudeste. Segundo o Ministério da Saúde, de dezembro de 2016 até março de 2017, foram notificados 1.186 casos de recém-nascidos e crianças com alterações no crescimento e desenvolvimento, decorrentes da infecção pelo ZIKV, com 407 casos somente no estado do Rio de Janeiro (Brasil, 2017).

Este cenário ressaltou a necessidade de estudos que buscassem informações úteis para a estruturação do controle vetorial no Brasil e nos demais países americanos, de onde, no início da epidemia, não se tinha nenhuma informação sobre quais espécies de mosquitos teriam participação na transmissão e quais seriam os vetores primários. Dentre estes estudos, destacava-se a necessidade de se avaliar a competência vetorial de populações locais do *Ae. aegypti* e mesmo de outras espécies com possibilidade de transmitir a doença por suas características antropofílicas, frente ao ZIKV circulante. Neste caso, avaliamos a possibilidade da transmissão experimental de ZIKV pelo *Cx. quinquefasciatus* por se tratar de um mosquito que apresenta

comportamento antropofílico, distribuição e frequência semelhantes ao *Ae. aegypti*, com presença em todos estados do país.

Nesse aspecto, nosso trabalho obteve um conjunto de resultados que agregam informações originais e que puderam colaborar na definição dos vetores e, portanto, evitar desperdícios de esforços no controle de mosquitos não-competentes para a transmissão e, ao mesmo tempo, focar esforços contra os vetores comprovados. Nosso conjunto de dados forneceu respostas para questionamentos sobre a necessidade ou não de incluir os mosquitos *Culex* nos programas de combate ao vetor do ZIKV no Brasil, o que levaria a uma grande alteração nos programa, dada as diferenças biológicas e comportamentais destes últimos em relação ao *Ae. aegypti*. A estratégia experimental buscando obter tais informações foram organizadas face à três principais hipóteses de objetivos.

4.1. Estimativa da competência vetorial de diferentes populações de *Cx. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro frente a dois isolados de ZIKV isoladas durante epidemia também no Rio de Janeiro.

Após desafiarmos, simultaneamente, quatro populações de *Cx. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro com duas cepas de ZIKV isoladas de pacientes também do Rio de Janeiro, não encontramos nenhuma evidência de que populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* possam colaborar na manutenção do ciclo de transmissão da do ZIKV no Brasil. Este foi o primeiro estudo a demonstrar a competência vetorial de populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* frente ao ZIKV, e o primeiro a testar populações naturais de *Ae. aegypti* do Brasil com cepas de ZIKV circulantes de mesma área.

Resultado semelhante foi observado, na pesquisa de Amraoui *et al.*, (2016), que utilizaram, porém, colônias com alto número de gerações em laboratório de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens*, respectivamente da Tunísia e Estados Unidos da América, desafiadas com uma cepa de ZIKV isolada na Nova Caledônia. Os autores não observaram competência desses mosquitos para a transmissão do ZIKV. Outros estudos também não obtiveram resultado positivo com mosquitos *Culex* desafiados com cepas do genótipo Asiático (Hart *et al.*, 2017; Weger-Lucarelli *et al.*, 2016).

Além desse insucesso na transmissão de genótipo Asiático em infecções experimentais, mosquitos do gênero *Culex* também foram refratários para cepas do genótipo Africano. Isso pode ser observado na pesquisa de Hall-Mendellin *et al.* (2016),

que desafiaram espécies australianas –*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. annulirostris*, e *Cx. sitiens* - com genótipo Africano de ZIKV (protótipo de Uganda - MR766), e encontraram baixa infecção, porém nenhuma disseminação ou transmissão foi detectada em nenhuma das espécies.

O único trabalho que vai de encontro com esses resultados é o estudo de Guo *et al.* (2016) que, utilizando mosquitos *Cx. p. quinquefasciatus* proveniente do sudeste da China alimentados com ZIKV de Samoa, Oceania (cepa SZ01), afirmam ter encontrado altas taxas de infecção, disseminação e transmissão, desde o segundo dia após exposição dos mosquitos ao vírus, principalmente no intestino dos mosquitos avaliados, e, apresentando na glândula salivar, picos elevados no quarto e oitavo dia. Muitos questionamentos foram levantados acerca destes resultados e, entre eles estaria a possibilidade de que os autores estivessem detectando resíduos de RNA do ZIKV no corpo dos insetos, nos quais não foi detectada partícula viral infectante. Os autores relataram também o encontro de genoma viral no sangue de camundongos que supostamente teriam sido picados por mosquitos experimentalmente infectados. Porém, a falta de controles negativos e de detalhes sobre os testes moleculares, assim como a ausência de ensaios de placa de lise, torna os resultados duvidosos. Recentemente, foi demonstrado que, tal como as demais populações de *Cx. quinquefasciatus* das demais partes do mundo, as da China são igualmente refratárias ao ZIKV (Liu *et al.*, 2017).

Em 2016 e 2017, 20 populações de *Culex* do complexo *Pipiens* foram desafiadas independentemente em vários laboratórios de todos os continentes e os resultados foram semelhantes aos observados neste estudo.

Ao contrário de *Cx. quinquefasciatus*, foi a alta susceptibilidade de mosquitos *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro frente as mesmas cepas de Zika analisadas nos experimentos.

Em laboratório, através de experimentos com alimentação oral, outros autores demonstraram altas taxas de infecção de mosquitos *Ae. aegypti* frente ao ZIKV (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016; Hall-Mendelin *et al.*, 2016), mas com taxas de disseminação e, principalmente, de transmissão, bem mais baixas que aquelas que observadas aqui.

Com efeito, estudos anteriores que também examinaram a competência de vetorial de mosquitos *Aedes* para transmissão de ZIKV têm resultados conflitantes. Wong *et al.* (2013), mostraram que *Ae. albopictus* de Singapura foram altamente susceptíveis à cepa ZIKV MR766 de Uganda, com 100% dos mosquitos com infecção

na saliva no 14^o dia após alimentação sanguínea. Em contraste, Diagne *et al.* (2015), relataram disseminação muito baixa e quase nenhuma transmissão de várias estirpes de ZIKV em mosquitos *Aedes* do Senegal. Chouin-Carneiro *et al.* (2016) apresentaram níveis elevados de infecção e níveis moderados e baixos de disseminação e transmissão em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* desafiados com cepa de ZIKV da Nova Caledônia.

Estes estudos demonstram variabilidade de resultados quando diferentes cepas de ZIKV foram desafiadas com distintas populações de mosquitos do gênero *Aedes*. Ou seja, linhagens distintas do vírus, espécies e populações de mosquitos de diversas localizações geográficas podem influenciar na transmissão do ZIKV. Com efeito, nos estudos supracitados, não foram feitos com combinações lógicas entre populações de mosquitos e vírus de mesma área e obtidos contemporaneamente, como os realizados neste estudo.

Embora as cepas Asiáticas do ZIKV formem um cluster monofilético robusto dentro do genótipo Asiático, e compartilhem um antepassado comum com a estirpe ZIKV que circulou na Polinésia Francesa, algumas alterações no seu genoma podem indicar uma evolução que explique sua alta disseminação nas Américas (Faria *et al.*, 2016).

Essa evolução foi registrada no trabalho de Wang *et al.* (2016), que avaliaram as relações filogenéticas de oito cepas africanas (sete obtidas de mosquitos e um de macaco) e 25 cepas asiáticas isoladas de humanos. Os autores observaram 59 variações na sequência de aminoácidos localizados ao longo dos genomas de ZIKV de genótipos Africanos e Asiáticos, bem como, entre diferentes cepas da linhagem Asiática. Segundo este estudo, tais variações na sequência do genoma poderiam ser resultado de alterações na proteína prM, que talvez desempenhe alterações na virulência ou no *fitness* das cepas de ZIKV.

As substituições de aminoácidos no genoma podem influenciar nas mudanças fenotípicas dos vírus, que conseqüentemente resulta em alterações na adaptabilidade dos vírus, virulência, modificações no tropismo de células hospedeiras e variação antigênica (Domingo e Holland, 1997), e uma ou poucas substituições já seriam suficientes para que isso ocorra. Como os vírus RNA têm grande taxa de mutação, isso pode favorecer sua adaptação em diferentes ambientes e hospedeiros.

O vírus Zika apresenta elevadas taxas de mutações (Faria *et al.*, 2016), que entre outros fatores, pode auxiliar na adaptação a diferentes ambientes, que, por sua

vez pode ter refletido na alta susceptibilidade de populações brasileiras de mosquitos a este vírus.

Muitos aspectos ainda devem ser esclarecidos com relação à evolução do ZIKV em hospedeiros vertebrados e invertebrados para elucidação dos processos de transmissão do vírus. Assim, pesquisas adicionais são necessárias para se entender em que proporção fatores genéticos dos mosquitos, assim como nos vírus podem ser responsáveis, por si só, pelo sucesso da transmissão do ZIKV. A microbiota e a resposta imune desenvolvida contra esta e contra aos vírus em si podem ter semelhante importância.

4.2. Avaliação da susceptibilidade de populações de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de áreas que reportaram elevada incidência de microcefalia e outras manifestações neurológicas e congênitas associadas à infecção pelo ZIKV no NE, quando desafiadas com cepas de ZIKV da mesma região e de outras origens no Brasil; e a competência vetorial de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro frente os mesmos isolados de ZIKV usados nos experimentos com *Cx. quinquefasciatus*.

Durante a discussão dos resultados dos ensaios com *Cx. quinquefasciatus* do Rio de Janeiro desafiados com ZIKV locais, e quando ainda se tinham raras investigações semelhantes acerca da competência vetorial de outras populações de *Culex* do complexo *Pipiens*, comentamos não ser totalmente descartável a hipótese de que outras combinações *Cx. quinquefasciatus* frente ao ZIKV apresentassem resultados distintos (Fernandes *et al.*, 2016). Em vista da elevada incidência de microcefalia e outras malformações associadas à infecção por ZIKV no Nordeste, onde coincidentemente existe elevada densidade de *Cx. quinquefasciatus*, que tem, por exemplo, permitido a transmissão da filariose bancroftiana, sugeriu-se o papel desta espécie como vetor biológico de ZIKV (Ayres *et al.*, 2016, Leal *et al.*, 2016).

De fato, *Cx. quinquefasciatus* é um mosquito de comportamento antropofílico e domiciliar, que pode transmitir, além da filariose, vírus dos gêneros *Aphavirus* e *Flavivirus*, como: Encefalite Equina Leste (Cupp *et al.*, 2003; Bingham *et al.*, 2016), Encefalite Equina Oeste (Houk *et al.*, 1986, Kramer *et al.*, 1983), EEEV (Weaver, 1986), Vírus do Nilo Ocidental (Komar, 2003; Eastwood *et al.*, 2011; Reisen *et al.*, 2013) e Encefalite Saint Louis (Reisen, 2003; Mondini *et al.*, 2007, Rodrigues *et al.*, 2010, Heinen *et al.*, 2015).

Corroborando as observações da competência vetorial de *Cx. quinquefasciatus* da região Sudeste frente ao ZIKV isolado na mesma região, os resultados mostraram que diferentes populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* de áreas onde ocorreram os maiores casos de microcefalia, como Pernambuco e Paraíba, apresentaram mínima ou nula infecção, e nenhuma disseminação e transmissão de cepas de ZIKV provenientes da mesma área, do Recife/PE, assim como de São Paulo/SP e do Rio de Janeiro/RJ. Ou seja, originárias do Nordeste ou não, de áreas com alta incidência de microcefalia ou não, desafiadas com cepas de ZIKV da mesma origem ou não, populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* são refratárias ao ZIKV.

Neste aspecto, além de características genéticas desses mosquitos que gerariam tal incompatibilidade ao ZIKV, algumas implicações na biologia ou interações ecológicas de mosquitos do gênero *Culex* e arbovírus podem influenciar na competência vetorial, como por exemplo, a presença da bactéria *Wolbachia* comum nestes mosquitos. A *Wolbachia* pode promover proteção de seus hospedeiros a alguns arbovírus (Oliveira e Moreira, 2012).

Algumas pesquisas evidenciaram a presença frequente da bactéria *Wolbachia* em mosquitos *Culex* do Brasil e Argentina (Moraes *et al.*, 2012) e na Califórnia (Ragon e Scott, 2003), assim como em outras áreas do Velho Mundo (Atyame *et al.*, 2011, Karami *et al.*, 2016). Ragon e Scott (2003) estimaram a presença de *Wolbachia* circulante em mosquitos do complexo *Culex pipiens* e compararam a transmissão vertical e fecundidade entre mosquitos de campo e de laboratório. Neste trabalho, a transmissão vertical maior foi observada em mosquitos de laboratório do que em mosquitos de campo e nenhuma alteração na fecundidade em fêmeas das duas diferentes condições. Esse resultado mostra que a bactéria não afeta no *fitness* – fecundidade – dos mosquitos. Isso pode ser resultado de um longo processo de evolução entre bactéria e hospedeiro e, que pôde proporcionar uma proteção dos mosquitos à determinados arbovírus.

Para avaliar se de fato a *Wolbachia* inibe infecção e disseminação de arbovírus em mosquitos do gênero *Culex*, Glaser e Meola (2010), avaliaram a taxa de transmissão do vírus do Oeste do Nilo por mosquitos *Cx. quinquefasciatus* tratados em não tratados com tetraciclina. Os autores descreveram taxa mais baixa de disseminação e de transmissão dos mosquitos tratados com tetraciclina (livres de *Wolbachia*) em comparação aos não tratados (com *Wolbachia*). Este trabalho aponta o papel da bactéria na disseminação deste arbovírus. É possível supor que a bactéria *Wolbachia* desempenhe também um papel fundamental na proteção de mosquitos

Culex frente ao ZIKV. Porém, observações recentes em laboratório indicaram que mosquitos *Cx. quinquefasciatus* de colônias do EUA, tratados ou não com tetraciclina, são igualmente refratários ao ZIKV (cepa da Nova Caledônia), não se verificando traços moleculares de resposta imune dos insetos, tratados ou não, sugerindo que a refratariedade é determinada geneticamente, possivelmente por falta de receptores compatíveis ao vírus (R. Lourenço-de-Oliveira, comunicação pessoal).

De fato, outro fator importante para o sucesso da competência vetorial é a capacidade que alguns arbovírus têm em atravessar as barreiras presentes em muitas espécies de mosquitos. Os mosquitos do gênero *Culex* apresentam a barreira de infecção intestinal (MIB), barreira de escape do intestino (MEB) e a barreira de infecção das glândulas salivares (SGIB) para outros arbovírus. Houk *et al.* (1979), Turell, Gargan e Bailey (1984) Turell e Coleman (1999), demonstraram susceptibilidade de *Culex* à cepas de Encefalite Equina Venezuelana somente quando os mosquitos eram desafiados via inoculação intratorácica, ou seja, saltando-se as MIB e MEB. No entanto, por esta via, o vírus não necessita ultrapassar essas barreiras intestinais. Os autores mencionam que a MIB estaria influenciando na disseminação do vírus no corpo dos mosquitos, e sugerem que o mesmo tipo de barreira pode ocorrer para outros arbovírus da família *Flaviviridae*.

Dessa forma, muitas questões relacionadas ao hospedeiro invertebrado ainda não foram esclarecidas, e por isso, necessitam de mais pesquisas voltadas para avaliação dos fatores que influenciam na competência vetorial de diferentes espécies de mosquitos.

O conjunto dos resultados desse trabalho e daqueles do trabalho anterior com populações de *Cx. quinquefasciatus* do Rio de Janeiro, eleva para seis o número de populações brasileiras dessa espécie investigadas quanto à competência transmissão de ZIKV, com 17 combinações entre cepas de ZIKV isoladas no Brasil e populações naturais deste mosquito do país. Em todos os casos, foi demonstrado que este mosquito não pode ter contribuído como vetor biológico durante o surto de zika no Brasil, ressaltando a necessidade de focar as ações de combate ao principal vetor da Zika, o *Ae. aegypti*.

Porém, ainda que *Ae. aegypti* tenha comprovado laboratorialmente e na natureza ser vetor primário de ZIKV no Brasil e em outros países, as taxas de infecção natural têm sido baixas em exame de espécimes dessa ou de outras espécies com ZIKV, mesmo durante epidemias (Grard *et al.*, 2015, Ferreira-de-Brito *et al.*, 2016, Gerbois *et al.*, 2016). Essa constatação pode sugerir baixa competência vetorial em

algumas populações geográficas ou a existência de limiares mínimos de carga viral para o estabelecimento da infecção nos mosquitos.

4.3. Análise da infectividade do ZIKV para mosquitos *Ae. aegypti* desafiados, por via oral, diretamente sobre macacos-rhesus virêmicos ou em sistema artificial contendo repastos sanguíneos, apresentando diferentes concentrações do vírus.

Obtivemos baixa infectividade de mosquitos alimentados com sangue de macacos-rhesus expostas à cepa de ZIKV do Espírito Santo, ES, mesmo quando os *Ae. aegypti* foram alimentados diretamente sobre elas, no pico de viremia (2º dpi).

A titulação de amostras do soro da macaca que teve a viremia mais elevada por qRT-PCR (10^8 cópias de RNA/mL), apresentou um baixo número de partículas infectantes ($5,75 \times 10^3$ a $1,3 \times 10^4$ pfu/mL). Esse resultado pode indicar um possível limite de infectividade desta cepa de ZIKV para a população de mosquitos utilizada no experimento.

É possível que o uso de outras populações de mosquitos *Ae. aegypti* mostrassem resultados diferentes. Com efeito, Roundy *et al.* (2017) observaram resultado semelhante com mosquitos *Ae. aegypti* de Salvador, Bahia que se alimentaram com cepas de ZIKV do genótipo Asiático, isolada do Camboja e do continente Americano, em que houve baixa e nenhuma infecção. No entanto, infecção com a cepa Africana foi observada. Outras duas populações da mesma espécie – de São Domingos e do Texas - se comportaram diferentemente frente às mesmas cepas e concentrações de ZIKV no repasto. Ressalta-se que, no experimentos de Roundy *et al.* (2017) a infecção dos mosquitos foi mais eficiente quando alimentados diretamente em camundongos infectados que por alimentadores artificiais.

O título viral pode influenciar nos resultados de competência vetorial, não somente para o ZIKV, mas também outros arbovírus. Diallo *et al.*, (2008), avaliaram a competência vetorial de populações de *Ae. aegypti* do Senegal para dois isolados de DENV-2, sendo um deles uma cepa silvestre. Foi demonstrado que, a diferença nas taxas de disseminação foi decorrente do título viral usado nos diferentes experimentos ($10^{6.5}$ e 1.6×10^7 TCID₅₀). Em pesquisa com diferentes concentrações de CHIKV, Pesko *et al.*, (2009) observaram melhores resultados (80%) de disseminação em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* alimentados artificialmente com concentrações entre 5.2 a 6.1 log₁₀ de ZIKV/mL, comparado com concentração de 3.6 log₁₀/mL (menos de 20%).

Este é o primeiro trabalho a demonstrar resultados de infecção em mosquitos *Ae. aegypti* alimentados a partir de uma modelo de infecção em primatas não humanos com o ZIKV.

O pico de viremia nas macacas ocorreu entre o primeiro e terceiro dia da injeção infectante; a partir do quarto dia, não encontramos partículas virais infectantes no soro. Com efeito, ainda que poucos mosquitos tenham se infectado em uma das macacas no 2^o dpi, nenhum se infectou ao tomar sangue nesta mesma macaca ou na outra, no 4^o dpi e nos dias subsequentes. Neste sentido, pode-se sugerir que o sistema imunológico das macacas poderia ter apresentado rápida resposta à infecção por ZIKV (a partir do quarto dia de infecção). No estudo de Dudley *et al.*, (2016), macacas grávidas infectadas com cepa Asiática de ZIKV apresentaram o pico de ativação da resposta imune adaptativa e produção de anticorpos entre 5 e 7 dias pós-infecção. Estas respostas imunológicas podem ser importantes para controlar a replicação viral, levando à redução de cargas de RNA no plasma neste período de tempo (Dudley *et al.*, 2016).

Há poucos dados sobre viremia em humanos e sua potencialidade como fonte de infecção para mosquitos. Em 1956, Bearcroft, infectou um humano voluntário na África com suspensão de cérebro de camundongos inoculados com cepa de ZIKV africana. Após a análise do sangue a cada 2 dias (4, 6 e 8 dpi), lotes de *Ae. aegypti* foram alimentados no indivíduo no 5^o dpi. No 4^o dpi (pico de viremia), a quantidade de partículas infectantes para camundongo lactantes inoculados com o soro do paciente foi baixa (1 camundongo LD₅₀/0,30mL) e nenhum *Ae. aegypti* alimentado no 5^o dpi foi capaz de transmitir o vírus.

O número estimado de cópias de genoma circulando em pacientes infectados com ZIKV durante o surto de 2007 na Ilha do Pacífico de Yap foi relatado como sendo $0,9 \times 10^3$ - $7,2 \times 10^5$ cDNA cópias/mL (Lanciotti *et al.*, 2008). Esses níveis relativamente baixos de viremia entre os pacientes infectados com ZIKV estão muito distantes daqueles relatados para outros arbovírus, como o CHIKV e DENV-2, onde foram relatados 10^7 e 10^8 cópias de cDNA/mL, respectivamente (Caron *et al.*, 2012). No entanto, estão no intervalo de outras infecções de *Flavivirus*, como a do Vírus do Oeste do Nilo, onde são observadas cargas virais próximos de $6,9 \times 10^5$ cópias/mL (Pupella *et al.*, 2013). Nesse aspecto, se fez indispensável avaliar as diferentes cargas virais necessárias para que haja infecção de mosquitos vetores.

Em nossos experimentos de infecção oral artificial com diferentes diluições no repasto infectante obtivemos altas taxas de infecção com as diluições mais elevadas.

Outros autores demonstraram sucesso na infecção e disseminação de ZIKV em experimentos de infecção artificial, com títulos virais semelhantes ao usados nesta pesquisa com outras cepas de ZIKV (Fernandes et al., 2016; Chouin-Carneiro et al., 2016).

Esses resultados sugerem que a infecção de mosquitos se dá essencialmente quando expostos a concentrações elevadas das cepas de ZIKV. No entanto, os resultados dos experimentos de alimentação artificial devem ser discutidos com cautela., uma vez que, a infecção de mosquito após uma refeição de sangue virêmico diretamente no hospedeiro pode demandar um limiar de infecção que não precise, necessariamente, de elevadas cargas virais (Roundy *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que analisamos a viremia em soro, tanto por qRT-PCR ou ensaios de unidades formadora de placas de lise, e não em sangue total, o que é de fato o ingerido pelo mosquito. É possível que os títulos de ZIKV sejam distintos em soro e sangue total.

Neste cenário, ressalta-se que são necessários maiores estudos envolvendo o ciclo homem-mosquito-vírus com diferentes cepas virais de ZIKV e em distintas concentrações, para que os diferentes limiares de infecção deste arbovírus possam ser estabelecidos, uma vez que estas informações serão de relevância para a epidemiologia da doença e na projeção de programas de controle das doenças.

5. CONCLUSÕES

- As populações de *Cx. quinquefasciatus* do Rio de Janeiro avaliadas neste trabalho apresentaram-se refratárias as cepas do ZIKV isoladas a partir de urina e saliva de pacientes no Rio de Janeiro.
- Populações de *Cx. quinquefasciatus* de áreas com alta incidência de casos de microcefalia como Recife e Campina Grande não foram capazes de transmitir cepas de ZIKV de mesma localidade e de outras áreas do Sudeste do Brasil como São Paulo e Rio de Janeiro que também apresentaram alta incidência de zika e incidência de casos de microcefalia.
- Os *Ae. aegypti* usados como controle positivo nos experimentos envolvendo *Cx. quinquefasciatus* com as mesmas cepas virais, foram susceptíveis, com altas taxas de infecção, disseminação e transmissão .
- O *Cx. quinquefasciatus* não deve ser considerado vetor biológico de ZIKV, ao passo que o *Ae. aegypti* reúne todas as características para ser considerado vetor primário, como também comprovado em achados de infecção natural.
- Populações de *Ae. aegypti* desafiados oralmente com ZIKV ao se alimentarem diretamente em macacos-rhesus infectados experimentalmente, apresentaram baixa taxa de infecção, exceto quando alimentados artificialmente com repastos de altos títulos virais, e, em diferentes concentrações.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar novos experimentos comparativos com diferentes populações de *Ae. aegypti* em sistema de alimentação e em modelo animal de infecção com diferentes cepas de ZIKV, para melhor entendermos os limiares das cargas virias que permitam a instalação da infecção oral dos mosquitos
- Avaliar a dose mínima de ZIKV existente em saliva de mosquitos capaz de infectar primatas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelman ZN, Miller DM, Myles KM. Bed Bugs and Infectious Disease: A Case for the Arboviruses. PLoS Pathog 2013;9(8):7–10.

Agaisse H, Perrimon N. The roles of JAK/STAT signaling in Drosophila immune responses 2004; 198(1):72–82.

Amaral RJV, Dansa-Petretski M. Interação Patógeno-Vetor: Dengue. In: Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, 2012. Disponível em <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>.

Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. Correction : Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya , Dengue , and Zika Outbreaks in Europe. 2016;1–2.

Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Failloux AB. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit zika virus. Eurosurveillance. 2016;21(35):1–4.

Anez G, Chancey C, Grinev A, Rios M. Dengue virus and other arboviruses: A global view of the risks. Int Soc Blood Transfusion, ISBT Sci Ser. 2012;7:274–82.

Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: Preliminary report of a case-control study. Lancet Infect Dis. 2016;16(December):1356–63.

Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, Weill M, Duron O. Diversification of *Wolbachia* Endosymbiont in the *Culex pipiens* Mosquito. Mol. Biol. Evol 2011;28(10):2761–2772.

Atkinson B, Hearn P, Afrough B, Lumley S, Carter D, Aarons EJ, et al. Detection of zika virus in semen. Emerg Infect Dis. 2016;22(5):940.

Ayres CFJ. Identification of Zika virus vectors and implications for control. www.thelancet.com/infection 2016;16. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00073-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00073-6)

Balm MND, Lee CK, Lee HK, Chiu L, Koay ESC, Tang JW. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus 2012; 84(9):1501–1505.

Black IV WC, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, Muñoz ML, Farfán-Alé JA, Olson KE, Beaty BJ, 2002. Flavivirus Susceptibility In *Aedes Aegypti*. Arch. Med. Res; 33 (4): 379– 388.

Barr AR. The distribution of *Culex p. pipiens* and *Culex p. quinquefasciatus* in North America. 1957. Am J Trop Med Hyg 6: 153–165.

Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D, Kafatos FC. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. EMBO J 1999;18(4):959-67.

Brackney DE, Beane JE, Ebel GD. RNAi targeting of West Nile virus in mosquito midguts promotes virus diversification. PLoS Pathog. 2009;5(7):1–9.

Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparco-goffart I, Lamballerie D. Complete Coding Sequence of Zika Virus from a French Polynesia. *Genome Announc.* 2014;2(3):2013–4.

Bearcroft WG. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956 Sep;50(5):442-8.

Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(13):8–11.

Bingham A. M. Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus disease—Florida. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2016; 65 475–478.

Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1956; 50:238 –242.

Borrego B, Novella IS, Andreu D, Giralt E, Domingo EJ. *Virol* 1993;67: 6071-6079.

Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ, Black WC., 4th Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics.* 2000;156:687–698.

Bosio C.F., Beaty B.J., Black W.C., IV Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998;59:965–970.

Brasil.Ministério da Saúde/ Secretaria de Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de Dengue, febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 2017b 48(12).

Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Microcefalias. Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil. In- forme epidemiológico 57/2016. Brasília: MS; 2017a.

Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Microcefalias. Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil. In- forme epidemiológico 28/2016. Brasília: MS; 2016b.

Brasil. Ministério da Saúde/ Secretaria de Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de Dengue, febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016a.

Brasil. Ministério da Saúde/ Secretaria de Saúde. PORTARIA No- 204, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2016.

Brès P. Recent data from serological surveys on the prevalence of arbovirus infections in Africa, with special reference to yellow fever. *Bull World Health Organ*1970; 43:223–267.

Brinton MA. Isolation of a replication-efficient mutant of West Nile virus from a persistently infected genetically resistant mouse cell culture. *J Virol.* 1981;39(2):413–421.

Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a

case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653–60.

Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, Faamoe A, Kilama S, Teurlai M, Mathieu-Daudé F, Dupont-Rouzeyrol M. Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004374.

Campos G, Bandeira A, Sardi S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1881.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1085–1086.

Carrington LB, Simmons CP. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Front Immunol*. 2014;5:1–8.

Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, Nso BBB et al. Recent Introduction and Rapid Dissemination of Chikungunya Virus and Dengue Virus Serotype 2 Associated With Human and Mosquito Coinfections in Gabon, Central Africa • *CID* 2012;55: 45-53.

Castillo JC, Robertson AE, Strand MR. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2006; 36(12):891-903.

Cirimotich CM, Scott JC, Phillips AT, Geiss BJ, Olson KE. Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol* 2009;9:49.

CDC. Centre for Disease Control and Prevention. Sintomas Zika. 2016. Disponível em: <https://portugues.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html>.

CDC. Centre for Disease Control and Prevention. Possível associação entre a infecção pelo vírus zika e a microcefalia - Brasil, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v. 65, n.3. 2016.

Chouin-Carneiro T, Santos FB. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. In: Vonnie D.C. Shields. *Biological Control of Pest and Vector Insects*. 2017: InTech. 358pp. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/biological-control-of-pest-and-vector-insects>

Chouin-carneiro T, Vega-rua A, Vazeille M, Yebakima A. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. 2016;1–11.

Couret J, Dotson E, Benedict MQ. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*. 2014;9(2).

Clements AN. *The Biology of Mosquitoes*. Oxford UK:CAB International 1999.

Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Sensory reception and behaviour*. Universidade de Michigan:Chapman & Hall;1992. 752p.

Clement NA. *Biology of Mosquitoes: Development Nutrition and Reproduction*. Universidade de Michigan:Chapman & Hall; 1992. 584p.

- Christophers SR. *Aedes aegypti* The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. 1960. Cambridge University Press, London, 738 p.
- Consolli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228p.
- Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. NIH Public Access 2015;23(11):2727–39.
- Cornet M, Robin Y, Adam C, Valade M, Calvo MA. Transmission expérimentale comparée du virus amaril et du virus Zika chez *Aedes aegypti* L. Comparison between experimental transmission of Yellow fever and Zika viruses in *Aedes aegypti*. Cah ORSTOM Sér Ent Méd Parasitol. 1979;XVII(2):47–53.
- Christensen BM, Li J, Chen C-C et al. Melanization immune responses in mosquito vectors. Trends Parasitol 2005; 21(4):192-199.
- Cupp EW, Klingler K, Hassan HK, Viguers LM, Unnasch TR. Transmission of eastern equine encephalomyelitis virus in Central Alabama. Am J Trop Med Hyg 2003;68(4):495–500.
- Darwish MA, Hoogstraal H, Roberts TJ, Ahmed IP, Omar F. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae)in Pakistan. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77:442– 445.
- Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. BMC Infect Dis 2015;15(1):492.
- Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. PLoS One. 2014;9(10):4–11.
- Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. BMC Infect Dis 2015;15(1):492.
- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus Isolations and serological specificity. Trans R Soc Trop Med Hyg 1952;46:509 –520.
- Dick O, San Martín J, Montoya R, Del Diego J, Zambrano B, Dayan G. The history of dengue outbreaks in the Americas. Am. J. Trop 2012; Med. Hyg. 87, 584–593.
- Diallo M, Ba Y, Faye O, Soumare ML, Dia I, Sall AA. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2008;102, 493–498.
- Diniz D. Vírus Zika e mulheres. Cad Saude Publica 2016;32(5):1–4.
- Domingo, E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu. Rev. Microbiol 1997;51, 151–178.
- Dong Y, Dimopoulos G. Anopheles fibrinogen-related proteins provide expanded pattern recognition capacity against bacteria and malaria parasites. J Biol Chem 2009; 284(15):9835-9844.

- D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016 Jun 2;374(22):2195-8.
- Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Weiler AM, Lehrer-Brey G, Weisgrau KL, et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun* 2016;7(May):12204.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009;360:2536–2543.
- Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daurès M, John M, Grangeon JP, Gourinat AC. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015;21:381–382.
- Eastwood G, Kramer LD, Goodman SJ, Cunningham A a. West Nile Virus Vector Competency of *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes in the Galapagos Islands. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(3):426–33.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., Rousset, D. Zika virus genome from the Americas. *Lancet* 2016;387, 227e228.
- Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond)* 1979; 83:213–219.
- Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol*. 2015;83:43–52.
- Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science [Internet]*. 2016;352(6283):aaf5036.
- Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, Oliveira JVC De, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20 th Century. 2014;8(1):1–10.
- Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda R M, Silva ABK, Castro MG et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 10(9): e0004993.
- Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Jules A, Hoffmann JA. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 2007;7: 862-874.
- Ferreira-De-Brito A, Ribeiro IP, Moraes De Miranda R, Fernandes RS, Campos SS, Antunes K, et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;1–4.
- Figueiredo LTM. How are so many foreign arboviruses introduced in Brazil? *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49(6):665–7.
- Figueiredo MLG, Figueiredo LTM. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47:677-683.

- Forattini, O.P. Entomologia médica. Parte geral, Diptera, Anophelini. v.1. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1962. 662p.
- Forattini,O.P. Entomologia Médica. Culicini: *Culex*, *Aedes* e *Psorophora*. v.2. São Paulo: Editora da USP;1965. 506p.
- Forattini OP. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia. v. 2. São Paulo: Editora USP; 2002.860p.
- Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, da Rosa AT, Haddow AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):880–2.
- Franco O. História da Febre Amarela no Brasil, Ministério da Saúde, DNERU, Rio de Janeiro 1969; 208 pp.
- Galiana-Arnoux D, Imler JL. Toll-like receptors and innate antiviral immunity. *Tissue Antigens* 2006; 67(4):267–276.
- Garrett-Jones C. The human blood index of malarial vectors in relationship to epidemiological assessment. *Bull World Heal Organ Hlth Org*. 1964;30:241–61.
- Glaser RL, Meola MA. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to west nile virus infection. *PLoS One*. 2010;5(8).
- Gokhale MD, Paingankar MS, Sudeep AB, Parashar D. Chikungunya virus susceptibility & variation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito from India. *Indian J Med Res*. 2015 Dec; 142(Suppl 1): S33–S43.
- Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* 2015; 21:84 – 86.
- Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 2002;33(4):330–42.
- Gubler DJ, Vasilakis N. Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. UK: Caister Academic Press; 2016.
- Gubler DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001 951: 13–24.
- Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, et al. Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis* 2016; 214 (9): 1349-1356.
- Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ*. 2016;352:i657. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, Fontenille D, Paupy C, Leroy EM. 2014. Zika virus in Gabon (CentralAfrica)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2681.
- Haddow AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda

forest. Bull World Health Organ 1964;31:57– 69.

Hall-Mendelin S, Pyke AT, Moore PR, Mackay IM, McMahon L, Ritchie SA, et al. Assessment of Local Mosquito Species Incriminates *Aedes aegypti* as the Potential Vector of Zika Virus in Australia. 2016;1–14.

Hardy WD. The virology, immunology and epidemiology of the feline leukemia virus. In: Hardy WD Jr., Essex M, McClelland A, editors. Feline leukemia virus. Elsevier/North-Holland; New York, New York: 1980. pp. 33–78.

Hardy J.L., Houk E.J., Kramer L.D., Reeves W.C. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. Annu. Rev. Entomol. 1983;28:229–262.

Hart CE, Roundy CM, Azar SR, Huang JH, Yun R, Reynolds E, et al. Zika Virus Vector Competency of Mosquitoes, Gulf Coast, United States. Emerg Infect Dis 2017;23(3):2–3.

Heang V, Yasuda CY, Sovann L, Haddow AD, Travassos da Rosa AP, Tesh RB, et al. Zika virus infection, Cambodia. Emerg Infect Dis 2012; 18:349 –351.

Heinen LBS, Zuchi N, Serra OP, Cardoso BF, Gondim BHF, Santos MAM et al. Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2015;57(3):215–20.

Heitmann A, Jansen S, Lühken R, Leggewie M, Badusche M, Pluskota B, et al. Experimental Transmission of Zika Virus By Mosquitoes From Central Europe. Eurosurveillance 2017;22(2):2–4.

Hennessey M, DVM, Fischer M, Staples E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016 MMWR 2016; 65(3);55–58.

Hernández-Martínez S, Lanz-Mendoza H, Rodríguez MH, González-Ceron L, Tsutsumi V. Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol 2002; 39, 61–69.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and Plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. J. Parasitol 2003; 89, 62–69.

Hillyer JF. Mosquito Immunity. In: Söderhäll K. Invertebrate Immunity. Uppsala: Springer US; 2010. p. 218-238.

Hills SL, Russell K, Hennessey M, et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016;65:215–216.

Houk EJ, Kramer LD, Hardy JL, Presser SB. An interspecific mosquito model for the mesenteron infection barrier to western equine encephalomyelitis virus (*Culex tarsalis* and *Culex pipiens*). Am J Trop Med Hyg. 1986;35(3):632–41.

Houk EJ, Obie F, Hardy JL. Peritrophic membrane formation and the midgut barrier to arboviral infection in the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett (Insecta, Diptera) Acta Trop 1979;36:39–45.

Hughes RAC, Cornblath DR, Willison HJ. Guillain-Barré syndrome in the 100 years since its description by Guillain, Barré and Strohl 2016; 139(11): 3041-3047.

Hugh JW, Bart CJ, Pieter AVD. Guillain-Barré syndrome: a systematic review. *Lancet*. 2016 Aug;388(10045):717-27.

Karami M, Moosa-Kazemi SH, Oshaghi MA, Vatandoost H, Sedaghat MM, Rajabnia R. *Wolbachia* Endobacteria in Natural Populations of *Culex pipiens* of Iran and Its Phylogenetic Congruence. *J Arthropod Borne Dis*. 2016; 10(3): 347–363.

Karabatsos N. International Catalogue of Arbovirus, Including Certain Other Viruses of Vertebrates. 1985. In: Centers of Disease Control and Prevention - Arbovirus Catalog, 2016.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. International Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. 2012. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. pp. 193-210.

Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth NM, Edwards E, Hettler DL, et al. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis J* 2003;9(3):311.

Kokernot RH, Casaca VM, Weinbren MP, McIntosh BM. Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of indigenous residents of Angola. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1965; 59:563–570.

Konopova B, Zrzavy J. Ultrastructure, development, and homology of insect embryonic cuticles. *J Morphol*. 2005;264:339–362.

Kostyuchenko VA, Lim EXY, Zhang S, Fibriansah G, Ng T-S, Ooi JSG, et al. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature [Internet]*. 2016;533(7603):425–8.

Kuno G, Chang GJJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* 2007;152(4):687–96.

Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol* 2009;9:160.

Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: Towards a new paradigm? *Trends Parasitol*. 2011;27(3):111–4.

Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, del Carmen Castillo Signor L. 29 January 2016. Phylogeny of Zika virus in Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis* 2015. Dis <http://dx.doi.org/10.3201/eid2205.160065>.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1232–9.

Leal WS. Zika mosquito vectors: the jury is still out. *F1000Research* 2016, 5:2546.

Leger P, Lara E, Jagla B, Sismeiro O, Mansuroglu Z, Coppee JY, et al. Dicer-2- and Piwi-Mediated RNA Interference in Rift Valley Fever Virus-Infected Mosquito Cells. *J Virol* 2013;87(3):1631–48.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent

antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6):973-83.

Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields Virology* 2013; v. 1, 6th ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Liu Z, Zhou T, Lai Z, Zhang Z, Jia Z, Zhouavailable G. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. *Emerging Infection Disease* 2017;23 (7).

Loos S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect [Internet]*. 2014;44(7):302–7.

Lourenço-de-Oliveira R. Transmissão Vetorial. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. *Dengue Teorias e Práticas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015.p.128-146.

Lourenço-de-Oliveira R, Castro MG, Braks M a H, Lounibos LP. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J Vector Ecol*. 2004;29(1):94–100.

Lourenço-de-Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:799-800.

Lord CC, Rutledge CR, Tabachnick WJ. Relationships between host viremia and vector susceptibility for arboviruses. *J Med Entomol*. 2006;43:623–630.

Lowenberger C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2001; 31(3):219-229.

McCarthy, M. US health officials investigate sexually transmitted Zika virus infections. *BMJ*. 2016; i1180.

Malta JMAS, Vargas A, Leite PL e, Percio J, Coelho GE, Ferraro AHA, et al. Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde* 2017;26(1):09–18.

Mallet HP, Vial AL, Musso D. Bilan de l'épidémie à virus Zika en Polynésie française, 2013–2014. French Polynesia outbreak of Zika in French Polynesia, 2013–2014. *Bull Inform Sanit Epidemiol* 2015; 13:1–5.

Manrubia SC, Escarmís C, Domingo E, Lázaro E. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene*. 2005;347(2 SPEC. ISS.):273–82.

Mansuy JM, Dutertre M, Mengelle C, Fourcade C, Marchou B, Delobel P, et al. Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect Dis* 2016;16(4):405.

McCrae AWR, Kirya BG. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982;76:552–562.

Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1954; 48:139 –145.

Magalhães RCS. *A erradicação do Aedes aegypti: febre amarela, Fred Soper e saúde pública nas Américas (1918-1968)*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2016. 420 pp.

- Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 1969;18:411–415.
- Mondini A, Cardeal ILS, Lazaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(300):176–8.
- Morais SA, Almeida Fd, Suesdek L MM. Low genetic diversity in wolbachia- infected *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54(6):325–9.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med* 2016; 374:951-958.
- Mueller S, Gausson V, Vodovar N, Deddouche S, Troxler L, Perot J, Pfeffer S, Hoffmann JA, Saleh MC, Imler JL. RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*. *PNAS* 2010;107(45): 19390-5.
- Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews* 2016; 29(3): 487-524.
- Musso D, Baud D. Zika virus: time to move from case reports to case control. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 620–21.
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):359–61.
- Musso D, Roche C, Roche C, Nhan T, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V. Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology* 2015; 68: 53–55.
- Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O595–O596.
- Naccache SN, Thézé J, Sardi SI, Somasekar S, Greninger AL, Bandeira AC, et al. Distinct Zika virus lineage in Salvador, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(10):1788–92.
- Ngoagouni C, Kamgang B, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases? *Parasit Vectors* 2015;8:191.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue virus in Brazil. *Dengue Bull*. 2002;26:1–10
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SMO, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1991: co-circulation of dengue 1 and dengue 2. *Epidemiol Infect* 1993;111: 163-170.
- Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer M, Oliveira LF. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine* 2015;13 (102): 1-10.
- Oehler E, Fournier E, Leparc-Goffart I, Larre P, Cubizolle S, Sookha-reea C, Lastère S, Ghawche F. December 2015. Increase in cases of Guillain-Barré syndrome during a chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015. *Euro Surveill* <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.48.30079>.

- Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo De Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 47: 6–7.
- Oliveira CD, Moreira LA. Uso de *Wolbachia* no Controle Biológico. In: *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, Rio de Janeiro, 2012.
- Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75:389–393.
- Pan American Health Organization. Epidemiological alert: neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. Dec 1, 2015.
- Pan American Health Organisation. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. *Pan Am Heal Organ* [Internet]. 2015;1–11. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en.
- Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med*. 2016;17(6):671–9.
- Patiño-Barbosa AM, Medina I, Gil-Restrepo AF, Rodriguez-Morales AJ Zika: another sexually transmitted infection? *BMJ Journals* 2015; 91(5).
- Pesko K, Westbrook CJ, Mores CN, Lounibos LP, Reiskind MH. Effects of Infectious Virus Dose and Bloodmeal Delivery Method on Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to Chikungunya Virus. *J Med Entomol*. 2009;46(2):395–9.
- Prasad VM, Miller AS, Klose T, Sirohi D, Buda G, Jiang W, et al. Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2017;24(2):184–6.
- Pupella S, Pisani G, Cristiano K, Catalano L, Grazzini G. West Nile virus in the transfusion setting with a special focus on Italian preventive measures adopted in 2008-2012 and their impact on blood safety. *Blood Transfus* 2013; 11: 563-74.
- Rasgon JL, Scott TW. *Wolbachia* and Cytoplasmic Incompatibility in the California *Culex pipiens* Mosquito Species Complex: Parameter Estimates and Infection Dynamics in Natural Populations. *Genetics*. 2003;165(4):2029–38.
- Reiskind MH, Lounibos LP. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. 2009; 23:(1):62–68.
- Reisen WK. Ecology of West Nile virus in North America. *Viruses*. 2013;5(9):2079–105.
- Reisen WK. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res*. 2003;61:139-83.
- Reisen, W.K. Estimation of vectorial capacity: introduction. *Bulletin of Society of Vector Ecology* 1989; 14, 39-40.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol*. 2008;8(1):82.

- Ribeiro JM, Arca B, Lombardo F, Calvo E, Phan VM, Chandra PK, Wikel SK. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. BMC Genomics. 2007;8:6.
- Rodriguez-Morales AJ, Bandeira AC, Franco-Paredes C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2016; 15: (13): 1-2.
- Rodrigues SG, Nunes MRT, Casseb SMM, Prazeres ASC, Rodrigues DSG, Silva MO, et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: Genetic divergence and dispersal. J Gen Virol. 2010;91(10):2420–7.
- Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E,Guillaumot L, Souares Y. 2014. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014.
- Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souares Y. 2014. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. Euro Surveill 19:20929.
- Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. Emerg Infect Dis. 2017;23(4):625–32.
- Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiol 2007;7:9.
- Saluzzo JF, Ivanoff B, Languillat G, Georges AJ. Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian population of the South-East of Gabon. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1982; 75:262–266
- Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW. Population incidence of Guillain-Barré syndrome: A systematic review and meta-analysis. Neuroepidemiology. 2011;36(2):123–33.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro 1986. Mem Inst Oswaldo Cruz 81: 245-246.
- Shi Y, Gao GF. Structural Biology of the Zika Virus. Trends in Biochemical Sciences, em impressão.
- Smith JL, Fonseca DM. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae). Am J Trop Med Hyg. 2004;70(4):339–4.
- Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. Science. 2016; 352(6284): 467-70.
- Siu RWC, Fragkoudis R, Simmonds P, Donald CL, Chase-Topping ME, et al. Antiviral RNA Interference Responses Induced by Semliki Forest Virus Infection of Mosquito Cells: Characterization, Origin, and Frequency-Dependent Functions of Virus-Derived Small Interfering RNAs. J Virol 2011; 85: 2907–2917
- Sylvestre G, Gandini M, Maciel-de-Freitas R. Age-Dependent Effects of Oral Infection

- with Dengue Virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feeding Behavior, Survival, Oviposition Success and Fecundity. PLoS One. 2013;8(3):1–8.
- Sociedade Internacional para Doenças Infecciosas. Dengue, Zika e chikungunya - Brasil (02) (MG), situação epidemiológica. Arquivo Número: 20170415.4973359, 2017.
- Telford AD. The pasture *Aedes* of central e northern California. The egg stage: gross embryology and resistance dissection. Ann Ent Soc Amer. 1957; 50:537-543.
- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg. Infect. Dis 2011; 17: 938-940
- Thomas DL, Sharp TM, Torres J, Armstrong PA, Munoz-Jordan J, Ryff KR et al. Local transmission of Zika virus e Puerto Rico, November 23, 2015 e January 28, MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep 2016; 65:154-158.
- Turell MJ, Bailey CL, Rossi C. Increased mosquito feeding on Rift Valley fever virus-infected lambs. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1984;33, 1232–1238.
- Turell MJ, Barth J, Coleman RE. Potential for Central American mosquitoes to transmit epizootic and enzootic strains of Venezuelan equine encephalitis virus. J Am Mosq Control Assoc 1999;15(3):295–8.
- Urosevic, N., and G. R. Shellam. Host genetic resistance to Japanese encephalitis group viruses. Curr Top Microbiol. Immunol. 2002;267:153-170.
- Vargas HCM, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. J Insect Physiol. 2014;62(1):54–60.
- Vasilakis N, Weaver SC. Flavivirus transmission focusing on Zika. Curr Opin Virol 2017;22:30–5.
- Vega-Rúa A, Lourenço-De-Oliveira R, Mousson L, Vazeille M, Fuchs S, Yébakima A, et al. Chikungunya Virus Transmission Potential by Local *Aedes* Mosquitoes in the Americas and Europe. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(5):1–18.
- Venturi G, Zammarchi L, Fortuna C, Remoli ME, Benedetti E, Fiorentini C, et al. An autochthonous case of zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. Eurosurveillance. 2016;21(8):1–4.
- Vinogradova EB, *Culex pipiens pipiens* Mosquitoes: Tax- onomy, Distribution, Ecology, Physiology, Genetics, Applied Importance and Control. 2000. Moscow, Russia: Pensoft. 250 p.
- Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, Brasil P, et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. Cell Host Microbe. 2016;19(5):561–5.
- Weger-lucarelli J, Chotiwan N, Nguyen C, Ru C, Luna MG, Fauver JR, et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. 2016;1–16.
- Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. Antiviral Res 2016;130:69–80.

Weaver SC, Reisen WK. Present and Future Arboviral Threats. v. 85, Antiviral Research. 2010. 1-36 p.

Weaver SC. Electron microscopic analysis of infection patterns for Venezuelan equine encephalomyelitis virus in the vector mosquito, *Culex (Melanoconion) taeniopus*. Am J Trop Med Hyg. 1986;35(3):624–31.

Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ 1996. Natural cycles of vectorborne pathogens. In BJ Beaty, WC Marquardt (eds), *The Biology of Disease Vectors*, University Press of Colorado, Niwot, 632 pp.

Wong PJ, Li MI, Chong C, Ng L, Tan C. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. 2013;7(8):1–5.

WHO. World Health Organization. Arthropod-borne and rodent borne viral diseases. Vol. 719, World Health Organization Tech. Rep. Ser. 1985. p. 1–115.

WHO. World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. 2012.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog 2008;4(7):e1000098.

Zammarchi L, Tappe D, Fortuna C, Remoli ME, Günther S, Venturi G, et al. Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull. 2015;20(23):2014–6.

Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(4):569–72.

First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America

Anielly Ferreira-de-Brito¹, Ieda P Ribeiro², Rafaella Moraes de Miranda¹, Rosilainy Surubi Fernandes¹, Stéphanie Silva Campos¹, Keli Antunes Barbosa da Silva¹, Marcia Gonçalves de Castro¹, Myrna C Bonaldo², Patrícia Brasil³, Ricardo Lourenço-de-Oliveira^{1/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Instituto Nacional de Infectologia, Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças Febris Agudas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Zika virus (ZIKV) has caused a major epidemic in Brazil and several other American countries. ZIKV is an arbovirus whose natural vectors during epidemics have been poorly determined. In this study, 1,683 mosquitoes collected in the vicinity of ZIKV suspected cases in Rio de Janeiro, Brazil, from June 2015 to May 2016 were screened for natural infection by using molecular methods. Three pools of Aedes aegypti were found with the ZIKV genome, one of which had only one male. This finding supports the occurrence of vertical and/or venereal transmission of ZIKV in Ae. aegypti in nature. None of the examined Ae. albopictus and Culex quinquefasciatus was positive. This is the first report of natural infection by ZIKV in mosquitoes in Brazil and other South American countries. So far, Ae. aegypti is the only confirmed vector of ZIKV during the ongoing Pan-American epidemics.

Key words: Zika - *Aedes aegypti* - natural infection - *Culex quinquefasciatus* - *Aedes albopictus*

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) that originally circulated in enzootic cycles between sylvatic canopy-feeder mosquitoes and non-human primates in Africa (Dick et al. 1952, Weinbren & Williams 1958, Haddock et al. 1964). The virus recently emerged in the Pacific Ocean and subsequently caused a dramatic Pan-American epidemic after its first appearance in Brazil in 2015 (Duffy et al. 2009, Musso et al. 2014, Zanluca et al. 2015, Brasil et al. 2016). Although the virus can be transmitted between humans, transmission by mosquito bite is believed to be the most common way of virus dispersion in epidemic and endemic zones (Hills et al. 2016, Musso & Gubler 2016). *Aedes (Stegomyia) aegypti* has traditionally been considered to be the primary ZIKV vector to humans. It has been confirmed to be competent in transmitting the virus in laboratory assays (Boorman & Porterfield 1956, Chouin-Carneiro et al. 2016). Virus detection in field-caught specimens has been reported, although very infrequently (Marchette et al. 1969, Akoua-Koffi et al. 2001). While natural infections of ZIKV have been found in several hematophagous species in the enzootic cycles in Africa, viral detection in mosquitoes in epidemic urban areas have intriguingly been scarce to non-existent (Haddock et al. 1964, Faye et al. 2013, Diallo et al. 2014, Diagne et al. 2015, Musso & Gubler 2016). Except for finding the ZIKV genome in *Ae. al-*

bopictus and *Ae. aegypti* in Mexico, the virus was not detected in mosquitoes during ZIKV epidemics in the Pacific Ocean and in the American continent (Guerbois et al. 2016, PAHO/WHO 2016). However, detection of infections in wild-caught mosquitoes is imperative for determining the natural vectors. In this study, we report natural infections in mosquitoes during the Zika outbreak in Rio de Janeiro (Brasil et al. 2016), with the goal of determining the local natural ZIKV vectors.

Mosquitoes were caught indoors and around domiciles of suspected Zika cases soon after the emergence of ZIKV in Rio de Janeiro (Brasil et al. 2016), from June 2015 to May 2016. Mosquito captures were performed with backpack aspirators in a sample of households of suspected ZIKV infections as well as in adjacent dwellings. Captures were done during the same week as a medical interview and clinical diagnosis (Brasil et al. 2016). The insects were transported live to the laboratory, where they were sexed, identified to species, and visually screened according to feeding status on cold plates. Males and visually non-blood-fed females were pooled according to species, gender, and collection site, and were stored at a low temperature (N₂ or -80°C) until tested. The abdomen of 57% of the females was detached prior to examination if there were doubt about the efficacy of visual screening according to feeding status. The number of mosquitoes by pool varied from one to 10, consistent with the number of captured specimens at each site and day of collection. Mosquito pools were ground in Leibovitz L15 medium (Invitrogen) supplemented with 20% foetal bovine serum and centrifuged at 10,000 ×g for 5 min at 4°C. Mosquito homogenates were screened through real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) using the SuperScript III Platinum one-step RT-qPCR (Invitrogen) in Quant-

doi: 10.1590/0074-02760160332

+ Corresponding author: lourenco@ioc.fiocruz.br

Received 22 July 2016

Accepted 25 August 2016

Studio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For each reaction, we used 600 nM forward primer (5'-CTTGGAGTGCTTGTGATT-3', genome position 3451-3468), 600 nM reverse primer (5'-CTCCTCCAGT-GTTCATTT-3', genome position 3637-3620), and 800 nM probe (5'FAM- AGAAGAGAATGACCACAAA-GATCA-3'TAMRA, genome position 3494-3517). The reverse transcription was performed at 45°C for 15 min. The sequences of this primer set were kindly provided by Isabelle Lepark-Goffart (French National Reference Centre for Arboviruses, IRBA, Marseille, France). The qPCR conditions were 95°C for 2 min, followed by 40 amplification cycles of 95°C for 15 s, 58°C for 5 s, and 60°C for 30 s. For each run, numbers of ZIKV genomic RNA were calculated by absolute quantitation using a standard curve (Bonaldo et al. 2016).

To confirm ZIKV infection, the homogenate of the mosquito pool, positive when tested by RT-qPCR, was submitted to a RT-PCR. Initially, the viral RNA was reverse transcribed with the Superscript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamers primers, according to the manufacturer's recommendations. The reaction was carried out at 23°C for 10 min, 55°C for 10 min, and 80°C for 10 min. Then, the viral single-stranded cDNA was amplified by conventional PCR using GoTaq Green Master Mix (Promega) according to the manufacturer's recommendations. We performed two different analyses to detect viral RNA sequences in mosquito samples. In the first, employing the primers 5'-GC-TACTGGATTGAGAGTGAGAAG-3' (genome position: 3085 to 3107), and 5'-CTCAGAGATGGTCCTCTGTGTC-3' (genome position 3364 to 3385), it was possible to detect an expected 300 bp band. In the second analysis, we utilised a semi-nested PCR protocol. The primers were 5'-AGAGAATCTGGAGTACCGGATAA-3' (1373-1395) and 5'-GTATGACACGCCCTTCAATCT-3' (1872-1892) for the first step of amplification generating a 520 bp amplicon and 5'-GGCAAACGTGCTGGTTCTA-3' (1732-1751) for the second-step PCR raising a 161 bp fragment. The thermocycling program set up in a Veriti 96 Well thermocycler (Applied Biosystem) was one cycle of 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 40 s, 50°C for 40 s, 72°C for 30 s, one cycle of 72°C for 10 min, and a hold of 4°C for the first primer set. The next primer set was performed at one cycle of 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 40 s, 50°C for 40 s, 72°C for 35 s, one cycle of 72°C for 10 min, and a hold of 4°C. Finally, 10 µL of amplified products were detected by electrophoresis on a 2% agarose gel, visualised by ethidium bromide staining UV. Additionally, PCR reaction products were purified using a QIAquick PCR purification Kit according to the manufacturer's recommendations. Samples were then sequenced in both directions using the primers utilised in the PCR protocol on an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer with BigDye Terminator, version 3.1.

A total of 1,683 mosquitoes (720 females and 963 males), belonging to three species, were screened for ZIKV infection, as follows: 550 *Ae. aegypti* (315 females and 235 males, grouped in 198 pools), 26 *Ae. albopictus* (20 and 6; 21 pools) and 1,107 *Culex quinquefasciatus* (385 and 722; 249 pools). Three pools of *Ae. aegypti* were

positive for ZIKV: P08 and P09 respectively consisted of one female and one male collected in the district of Coelho da Rocha, municipality of São João de Meriti, and P17 had three females collected in the neighbourhood of Realengo, municipality of Rio de Janeiro. The cycle thresholds of positive pools, when screened by RT-qPCR, were 36.68 (P08), 37.78 (P09), and 38.04 (P17). The presence of ZIKV genome in the three pools was confirmed when tested by RT-PCR and semi-nested-PCR using distinct set of primers. The nucleotide sequences of P08 (134 amplicon), P09 (300 and 161 amplicons) and P17 (520 amplicon), covering structural and nonstructural viral genome regions, were determined. By means of Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), the nucleotide sequences (Supplementary data, Figs 1,2) displayed identity with the ZIKV strains of the outbreak occurring in the Americas (e.g., Bonaldo et al. 2016). Viral isolation could not be achieved from these *Ae. aegypti* positive pools because of yeast and bacterium contamination of the inoculated Vero cell monolayers. No other mosquito species tested positive for ZIKV.

This study is the first report of natural infection by ZIKV in mosquitoes in Brazil and other South American countries. Given the relevance of the challenges posed by ZIKV for the Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) and the importance of broad sharing of scientific data, the preliminary results of the present study were widely publicised in May 2016 [<http://www.sciencemag.org/news/2016/05/top-mosquito-suspect-found-infected-zika> (doi:10.1126/science.aaf5743); <https://journalsdiary.com/2016/05/27/finally-mosquito-species-transmitting-zika-virus-confirmed/>; <http://www.efe.com/efe/america/sociedad/expertos-brasilenos-confirman-que-aedes-es-el-principal-transmisor-del-zika/20000013-2934094>; <http://www.theglobeandmail.com/news/world/new-brazilian-research-may-confirm-the-mosquito-source-of-zika-virus/article30118331/>].

In the present study, only *Ae. aegypti* mosquitoes were found to be naturally infected. ZIKV was detected in field-collected *Ae. aegypti* in Asia, Africa, and North America, where this mosquito has been identified as ZIKV primary vectors (Marchette et al. 1969, Olson et al. 1981, Akoua-Koffi et al. 2001, Guerbois et al. 2016).

A remarkable finding of the present study was the detection of ZIKV infection in a male *Ae. aegypti* from Rio de Janeiro. As far as we know, this is the first detection of ZIKV infection in a male *Ae. aegypti*. Natural infection by ZIKV in male mosquitoes has only previously been reported in field collected *Aedes furcifer* from Senegal (Diallo et al. 2014). These findings together support the occurrence of vertical and/or venereal transmission of ZIKV in nature, a subject that deserves more investigation in light of its importance to ZIKV transmission dynamics.

Besides *Ae. aegypti*, other *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes have been shown to be potential natural vectors of ZIKV (Duffy et al. 2009, Ledermann et al. 2014, Musso & Gubler 2016). This is the case of *Ae. albopictus*, which was found naturally infected with the virus in Gabon in 2007 (Grard et al. 2014) and in Mexico in 2016 (PAHO/WHO 2016). In addition, an American population of *Ae. albopictus* (Vero Beach, Florida, USA) was

able to transmit ZIKV in the laboratory, although with low efficiency (Chouin-Carneiro et al. 2016). Thus, we cannot rule out the possibility that *Ae. albopictus* may transmit ZIKV in Brazil, and specific control strategies against this mosquitoes should be designed. However, given the very low *Ae. albopictus* capture rates indoors near dwellings with ZIKV cases in Rio de Janeiro, the lack of detection of ZIKV infection in wild specimens reported herein, and the usually low house index reported for *Ae. albopictus* in most Brazilian cities where Zika epidemics have been reported (Carvalho et al. 2014), there is still no sufficient evidence that this mosquito plays any role in ZIKV transmission in Rio de Janeiro, and throughout Brazil.

In contrast, *Ae. aegypti* fulfils all the requirements of a primary ZIKV vector in Rio de Janeiro, and throughout Brazil. It is a very anthropophilic and domestic mosquito with high vectorial capacity to transmit arboviruses (Juliano et al. 2014, Lourenço-de-Oliveira 2015). Together with *Cx. quinquefasciatus*, it is the most frequently occurring indoor man-biting mosquito in urban and suburban Zika epidemic sites in Rio de Janeiro, and throughout Brazil. However, while *Cx. quinquefasciatus* from Rio de Janeiro is not competent to transmit locally circulating ZIKV strains (Fernandes et al. 2016), Brazilian *Ae. aegypti* usually exhibits very high ZIKV transmission efficiency. As expected, vector competence to ZIKV depends on the specific pairing of mosquito populations and virus genotypes. Accordingly, one Brazilian *Ae. aegypti* population challenged with a New Caledonian ZIKV isolate exhibited low vector competence in the laboratory (Chouin-Carneiro et al. 2016). But other Brazilian *Ae. aegypti* populations subsequently exposed to four ZIKV isolates from Brazil consistently exhibited high transmission rates and efficiency (Dutra et al. 2016, Fernandes et al. 2016).

Therefore, the present finding of natural infections in *Ae. aegypti* in Brazil, and in Mexico (Guerbois et al. 2016), combined with the competence for ZIKV transmission experimentally determined in Brazilian and other American populations, reinforce *Ae. aegypti* as the primary and the only confirmed vector of ZIKV during the ongoing Pan-American epidemics.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Iule de Souza Bonelly, Marcelo Quintela Gomes, Marcelo Celestino do Santos, Renato Carvalho, Mauro M Muniz, Lidiane MS Raphael, Alexandre AC dos Santos, Marta Pereira Santos and Luciana de Jesus Mesquita, for technical support. We also thank Aline dos Santos Moreira, Renata Almeida de Sá and Beatriz de Lima Alessio Müller, from Plataforma Genômica-Sequenciamento de DNA/RPT01A/FIOCRUZ, for supporting in the nucleotide sequencing, Isabelle Lepark-Gofart, for providing the sequences of primer set, Maria Goreti Rosa-Freitas, for helping with the manuscript and submission, and the Municipal Secretary for Health of Rio de Janeiro, for technical assistance in the capture of the mosquitoes.

REFERENCES

- Akoua-Koffi C, Diarrassouba S, Benie VB, Ngbichi JM, Bozoua T, Bosson A, et al. Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Cote d'Ivoire in 1999. *Bull Soc Pathol Exot.* 2001; 94(3): 227-30.
- Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Santos AAC, Menezes LSR, Cruz SOD, et al. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(6): e0004816.
- Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956; 50(3): 238-42.
- Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(4): e0004636.
- Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(6): 787-96.
- Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(3): e0004543.
- Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis.* 2015; 15: 492.
- Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE.* 2014; 9(10): e10944.
- Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; 46(5): 509-20.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009; 360(24): 2536-43.
- Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. Wolbachia blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2016; 19(6): 771-4.
- Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology.* 2013; 10: 311.
- Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda R, Silva KAB, Castro MG. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro is not competent to transmit the local Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(9): e0004993.
- Grard G, Caron M, Mombou IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)-2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(2): e2681.
- Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, et al. Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis.* 2016; doi: 10.1093/infdis/jiw302.
- Haddock AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull World Health Organ.* 1964; 31: 57-69.
- Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, et al. Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission - continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65(8): 215-6.
- Juliano SA, Ribeiro GS, Maciel-de-Freitas R, Castro MG, Codeço C, Lourenço-de-Oliveira R, et al. She's a female fatal: low-density larval development produces good disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(8): 1070-7.

- Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M, Machieng P, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(10): e3188.
- Lourenço-de-Oliveira R. Transmissão vetorial. In: Valle D, Pimenta D, Cunha R, organizadores. *Dengue: teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015. p. 127-46.
- Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. 1969; 18(3): 411-5.
- Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29(3): 487-524.
- Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(10): O595-6.
- Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981; 75(3): 389-93.
- PAHO/WHO - Pan American Health Organization/World Health Organization. Zika virus detection in *Aedes albopictus* in Mexico. Zika Epidemiological Update, 21 April 2016 [Internet]. Washington (DC): PAHO/WHO; 2016 [cited 2016 July 21]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34243&lang=en.
- Weinbren MP, Williams MC. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1958; 52(3): 263-8.
- Zanluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110(4): 569-72.