

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

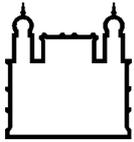
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ACURÁCIA DA ARMADILHA OVITRAMPA COMO FERRAMENTA  
SENSÍVEL E ECONÔMICA PARA DETERMINAR A FREQUÊNCIA DE  
*WOLBACHIA* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti*

CAMILA PEREIRA DE JESUS

Rio de Janeiro  
Abril de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*CAMILA PEREIRA DE JESUS*

Acurácia da armadilha ovitrampa como ferramenta sensível e econômica para determinar a frequência de *Wolbachia* em populações naturais de *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

**Orientador:** Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

**RIO DE JANEIRO**

Abril de 2018

Jesus, Camila Pereira de.

Acurácia da armadilha ovitrampa como ferramenta sensível e econômica para determinar a frequência de *Wolbachia* em populações naturais de *Aedes aegypti* / Camila Pereira de Jesus. - Rio de Janeiro, 2018.

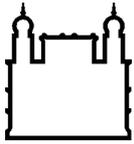
xv, 68 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientador: Rafael Maciel de Freitas.

Bibliografia: f. 52-68

1. Ovitampa. 2. *Aedes aegypti*. 3. Monitoramento de vetores. 4. *Wolbachia*. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: CAMILA PEREIRA DE JESUS***

**ACURÁCIA DA ARMADILHA OVITRAMPAS COMO FERRAMENTA SENSÍVEL E  
ECONÔMICA PARA DETERMINAR A FREQUÊNCIA DE *Wolbachia* EM  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti***

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas**

**Aprovada em: 27/04/2018**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. José Bento Pereira Lima - *Presidente*** (IOC – Fiocruz)

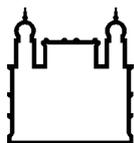
**Prof. Dr. João Silveira Moledo Gesto** (IRR - Fiocruz)

**Prof. Dr. Moacyr Alvim Horta Barbosa da Silva** (FGV)

**Prof. Dr. Arthur Weiss da Silva Lima** (UFRJ)

**Prof. Dr. Cleber Galvão** (IOC – Fiocruz)

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

À minha família que nunca me deixou lutar sozinha e ao meu esposo Luiz Vicente pela parceria e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Rafael Maciel de Freitas por quem tenho profunda admiração e respeito. Desde o início da minha chegada ao laboratório ele sempre foi um grande incentivador do meu contínuo aprendizado através de sua enorme competência, generosidade e cuidado. Obrigada pela confiança em mim depositada, por todo conhecimento transmitido ao longo dessa jornada, por ser exigente quando foi preciso, pela compreensão quando precisava ver a minha família no Maranhão e quando, em pleno processo de conclusão da dissertação, anunciei meu casamento. Você é benção de Deus na minha vida!

A toda equipe do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, que tem sido minha família ao longo desses cinco anos de estadia no Rio de Janeiro. Vocês tornam os meus dias longe da minha terra e dos meus familiares muito mais leves e divertidos. Um agradecimento muito especial à Martha Petersen pelas incontáveis horas despendidas em me ajudar na parte prática deste trabalho.

Aos membros da equipe do Programa “Eliminar a Dengue: Desafio Brasil” pelo suporte técnico. Minha gratidão à Catia, Bianca, Lilian e Jéssica que muito me ajudaram na criação dos mosquitos e à Priscila e Fernando por me receberem muito bem no laboratório e me ensinarem todo o processo de extração de DNA e detecção da Wolbachia via qPCR.

Ao Dr. Daniel Villela pela enorme contribuição com as análises matemáticas e por me receber em sua sala sempre muito solícito para pacientemente me nortear sobre o assunto quando o desespero era grande e eu não conseguia entender um número a minha frente.

À minha família que mesmo distante geograficamente esteve por perto me incentivando. Aos meus pais, Gilberto e Zenir que são meu exemplo de determinação, resiliência, humildade, integridade e fé. Aos meus irmãos, Diana e Hugo pela parceria. Vocês são os melhores! Às minhas tias Iracema e Maria José com seus respectivos maridos, que foram fundamentais ao me receberem e abrigarem na Cidade Maravilhosa. Sem a ajuda de vocês teria sido muito mais difícil.

Às minhas mais que amigas Natália Pereira e Márcia Rodrigues por viverem comigo nesses dois anos de Mestrado. Obrigada pelo incentivo, pelas palavras de

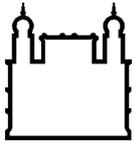
carinho, pelas repreensões, pelas lágrimas choradas juntas e pelos risos largamente distribuídos. À melhor célula de todos os tempos, Torre Forte, pelos ouvidos atentos às minhas angústias de mestrandia e pelas orações que me cobriam espiritualmente e fortaleciam minha fé.

Ao meu companheiro e amor, Luiz Vicente, que é meu grande incentivador nesse mundo da ciência. Me faltam palavras pra expressar o quanto eu sou feliz ao seu lado. Obrigada por dividir a vida comigo e sempre demonstrar seu amor, por me levantar quando me sinto sem forças e por ser o cara mais engraçado que eu conheço. Vou sorrir o resto da minha vida.

Àquele de onde procede toda ciência, conhecimento e sabedoria. Minha gratidão a Deus que me sustentou até aqui e me fez vivenciar os Seus milagres.

“Dedique à disciplina o seu coração e os  
seus ouvidos às palavras que dão  
conhecimento.”

Provérbios de Salomão



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

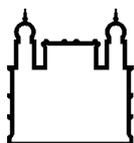
### **ACURÁCIA DA ARMADILHA OVITRAMPA COMO FERRAMENTA SENSÍVEL E ECONÔMICA PARA DETERMINAR A FREQUÊNCIA DE *Wolbachia* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti***

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Camila Pereira de Jesus**

Diversas metodologias promissoras de controle de arboviroses como Dengue Zika e Chikungunya têm sido desenvolvidas. Uma dessas metodologias envolve a substituição de populações selvagens de *Aedes aegypti*, altamente competentes a arbovírus, por outras portadoras de bactérias do gênero *Wolbachia*, incapazes de efetuar a transmissão. Entretanto, o controle dessas arboviroses pela utilização da *Wolbachia* só ocorrerá se a infecção com a bactéria for capaz de se fixar com sucesso na população de mosquitos de campo. Desde 2014 ensaios de liberação de mosquitos com *Wolbachia* vem ocorrendo no Brasil e, para o monitoramento da população de *Aedes aegypti*, bem como a invasão da bactéria, a BG-Sentinela é a principal armadilha para coleta. Todavia, outra armadilha, a ovitampa, vem sendo utilizada e estudada como recurso para monitoramento da *Wolbachia*. Com base nesse cenário avaliou-se através da aplicação de quantidade conhecida de mosquitos com e sem *Wolbachia* num ambiente simulado de campo, o real potencial da ovitampa para estimar a invasão da *Wolbachia* em diferentes cenários de campo. Os tratamentos testados foram 10:90, 25:75, 50:50, 75:25 e 90:10, os quais representaram os percentuais de mosquitos com e sem *Wolbachia* liberados no simulado de campo. Ao final dos ensaios de soltura de populações de *Aedes aegypti* com diferentes frequências de *Wolbachia* constatou-se que de modo geral as ovitampas conseguiram refletir com grande proximidade os tratamentos testados: Tratamento 10:90 (F=9,2%); Tratamento 25:75 (F=25,5%); Tratamento 50:50 (F=49,3%); Tratamento 75:25 (F=72%) e Tratamento 90:10 (F=88%). Cada tratamento experimentado representou um momento específico de uma curva de invasão da *Wolbachia* em campo em populações naturais de mosquitos *Aedes aegypti*. A partir de modelagem matemática, para cada um desses momentos, foi possível estimar a menor quantidade de amostras exigidas pelas ovitampas para *screening* com um baixo erro amostral e que ainda garantam a confiabilidade da invasão da bactéria em campo. Assim, os resultados obtidos demonstraram que cada tratamento requereu das ovitampas diferentes porcentagens de amostras, sendo que o tratamento 50:50 foi o que exigiu o menor valor (cerca de 20%) e o tratamento 75:25 requereu o maior, de modo que se mantivesse com um baixo erro amostral (em torno de 80%).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ACCURACY OF THE OVITRAP AS A SENSITIVE AND ECONOMICAL TOOL TO DETERMINE THE FREQUENCY OF *Wolbachia* IN NATURAL POPULATIONS OF *Aedes aegypti*

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITOLOGY BIOLOGY

Camila Pereira de Jesus

Several promising methodologies for controlling arboviruses such as Dengue, Zika and Chikungunya have been developed. One of these methodologies involves the substitution of wild populations of *Aedes aegypti*, highly susceptible to arboviruses, for others carrying bacteria of the genus *Wolbachia*, which are unable to transmit them. However, the control of these arboviruses by *Wolbachia* will only occur if the bacterium is able to successfully spread itself the field mosquito population. Since 2014, mosquito release trials with *Wolbachia* have been occurring in Brazil and, for the monitoring of the *Aedes aegypti* population, as well as the invasion of the bacterium, BG-Sentinel is the main trap for collection. However, another trap known as ovitrampa (or ovitrap), has also been studied and used as a monitoring tool for *Wolbachia*. Based on this scenario, the real potential of ovitrampa to estimate the invasion of *Wolbachia* in different field scenarios was evaluated through the application of known numbers of mosquitoes with and without *Wolbachia* in a simulated field environment. The treatments tested were 10:90, 25:75, 50:50, 75:25 and 90:10, which represented the percentages of mosquitoes with and without *Wolbachia* released in the field simulation. At the end of the release tests of *Aedes aegypti* populations with different frequencies of *Wolbachia*, it was observed that in general the ovitraps were able to reflect with great proximity the treatments tested: Treatment 10:90 (F = 9.2%); Treatment 25:75 (F = 25.5%); Treatment 50:50 (F = 49.3%); Treatment 75:25 (F = 72%) and Treatment 90:10 (F = 88%). Each treatment tested represented a specific moment of a field invasion curve of *Wolbachia* in natural populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. From mathematical modeling, for each one of these moments, it was possible to estimate the smallest number of samples required by the ovitraps for screening with a low sample error and still guarantee the reliability of the bacterial invasion in the field. Thus, the results obtained showed that each treatment required different percentages of samples from the ovitraps, in which the 50:50 treatment required the smaller value (about 20%) and the 75:25 treatment required the bigger, in order to keep the lowest possible sample error (around 80%).

# ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Dengue .....	1
1.2 Chikungunya.....	4
1.3 Zika .....	6
1.4 Biologia do <i>Aedes aegypti</i> : aspectos básicos.....	8
1.5 Controle Vetorial.....	10
1.5.1 Controle mecânico/físico.....	10
1.5.2 Controle químico.....	11
1.5.3 Controle biológico .....	12
1.6 Alternativas de controle.....	13
1.6.1 Mosquitos transgênicos .....	13
1.6.2 <i>Wolbachia</i> .....	14
1.7 Armadilhas e o monitoramento entomológico .....	17
1.7.1 Biogents-Sentinel.....	17
1.7.2 Ovitampa .....	19
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
3.1 Objetivo Geral .....	23
3.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
4.1 Área de estudo – Simulado de campo.....	24
4.2 Mosquitos – obtenção e criação em laboratório .....	25
4.3 Tratamentos.....	27
4.4 Detecção da <i>Wolbachia</i> .....	29
4.5 Modelagem.....	30
4.5.1 Efeito na fecundidade e fertilidade.....	30
4.5.2 Cálculo para o número de imaturos testados .....	31
4.5.3 Presença da <i>Wolbachia</i> .....	31

4.5.4	Cálculo para o percentual amostral para <i>screening</i> com baixo erro amostral .....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
5.1	Tratamentos .....	32
5.2	Frequência da <i>Wolbachia</i> .....	37
5.3	Modelagem.....	39
5.4	Revisitando o dado de campo.....	42
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	1
Figura 2.....	4
Figura 3.....	6
Figura 4.....	10
Figura 5.....	18
Figura 6.....	19
Figura 7.....	21
Figura 8.....	24
Figura 9.....	25
Figura 10.....	27
Figura 11.....	27
Figura 12.....	28
Figura 13.....	30
Figura 14.....	33
Figura 15.....	33
Figura 16.....	36
Figura 17.....	38
Figura 18.....	39
Figura 19.....	40
Figura 20.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> .....	34
<b>Tabela 2</b> .....	36
<b>Tabela 3</b> .....	37
<b>Tabela 4</b> .....	42

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BGS – Biogents-Sentinel

Bti – *Bacillus thuringiensis israelenses*

CDC – Centers of Disease Control

CHIKV – vírus chikungunya

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DDT – diclorofenil-difenil-tricloroetano

DENV – vírus dengue

DNA – ácido desoxirribonucleico

ECSA – linhagem do vírus chikungunya oriunda do Leste-Centro-Sul Africano

IC – incompatibilidade citoplasmática

IGR – regulador do desenvolvimento de insetos (“Insect Growth Regulator”)

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

*kdr* – resistência tipo “knock-down”

MILD – mosquiteiros impregnados com inseticida de longa duração

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PCR – reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction”)

qPCR – PCR em tempo real

RIDL – técnica de gene letal dominante (“Release of Insects containing Dominant Lethal gene”)

RNA – ácido ribonucleico

wMel – linhagem de *Aedes aegypti* com *Wolbachia*

wMelBr – linhagem de *Aedes aegypti* brasileiro (perfil suscetível a piretróides)

wMelRio – linhagem de *Aedes aegypti* brasileiro (perfil resistente a piretróides)

wMelTet – linhagem de *Aedes aegypti* curada da *Wolbachia* com tetraciclina

ZIKV – vírus zika

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dengue

A dengue é uma arbovirose cujo agente etiológico é o vírus dengue (DENV), que pertence ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*. Configurando-se como um dos principais problemas de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 1), pode apresentar-se sob a forma de 4 sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gluber e Kuno 1997). Uma vez infectado por um sorotipo viral, o indivíduo adquire imunidade restrita ao sorotipo em questão, mas não para os demais sorotipos. Assim, um indivíduo pode contrair o vírus da dengue por quatro vezes ao longo da sua vida. Halstead (1981) levanta a hipótese que infecções sequenciais aumentam o risco da ocorrência dos casos graves de dengue, dentre outros fatores, pelo conglomerado de anticorpos formados contra um dos sorotipos de dengue no organismo dos indivíduos infectados por novo sorotipo.

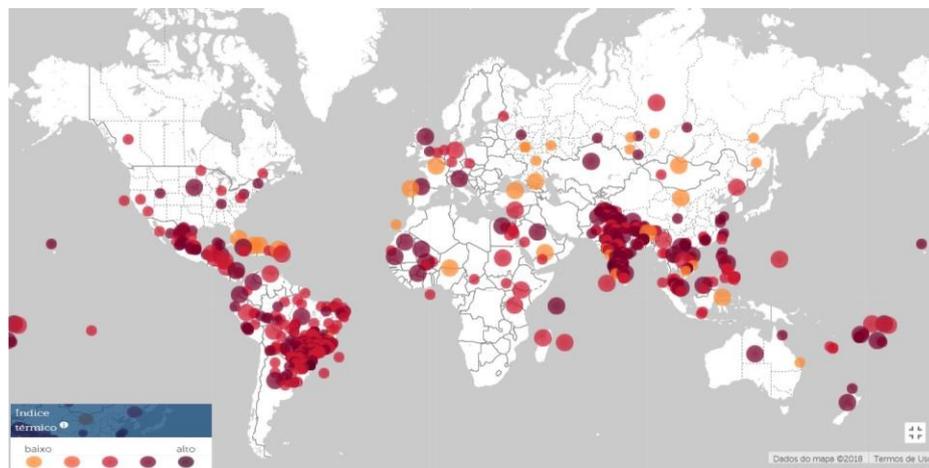


Figura 1: Mapa da distribuição potencial da Dengue entre 3 de setembro de 2017 e 3 de março de 2018. Os pontos indicam áreas de alerta conforme registro de casos reportados por organizações de saúde internacionais (Adaptação de: <http://www.healthmap.org/dengue/pt/>).

A primeira descrição detalhada dos sintomas da doença foi feita em 1780 nos Estados Unidos da América. Porém, o primeiro isolamento do vírus ocorreu somente em 1943 por Kimura. No ano seguinte, Hotta também conseguiu isolar o vírus que brevemente passou a ser denominado de Mochizuki (Kimura e Hotta 1943). Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa Havaí e nesse mesmo ano Sabin isolou

uma outra cepa em Nova Guiné (Sabin e Schlesinger 1945). Estas cepas foram posteriormente denominadas sorotipo 1 e sorotipo 2, respectivamente, por apresentarem características antigênicas diferentes. Os sorotipos 3 e 4 só foram isolados 11 anos depois no Sudeste asiático em meio a uma epidemia de dengue hemorrágico nas Filipinas e Tailândia (Martinez-Torres 1990, Figueiredo e Fonseca 2005, Teixeira et al 2009). Em 2007, um novo sorotipo (DENV-5) foi isolado em uma amostra de soro de um paciente na ilha de Bornéu na Malásia, mas parece não haver transmissão sustentada entre humanos (Normile 2013). Portanto, apesar da descrição desse vírus já possuir cinco anos, muitos ainda discutem se este encontro mostra um novo sorotipo (DENV-5) ou se trata de uma amostra com maior diferenciação genética, mas ainda inserida nos quatro sorotipos já descritos (Mustafa et al. 2015). Sendo assim, é necessário frisar que a numeração dos sorotipos de dengue reflete apenas a ordem na qual os sorotipos foram descritos, não havendo, portanto, nenhum indicativo de associação entre os sorotipos e virulência.

Historicamente, há relatos de seres humanos acometidos com sintomatologia semelhante ao dengue datados de 265 a 420 d.C na China (Nobuchi 1979). No século XVII, surtos associados ao dengue ocorreram em ilhas do Oceano Pacífico e no Panamá. Entretanto, teoriza-se que as primeiras epidemias da doença tenham de fato acontecido durante a segunda metade do século XVIII na Ásia, África e América do Norte (Nobuchi 1979, Gubler 1998). De acordo com Gluber (1998), os aspectos biológicos do DENV, do hospedeiro e do vetor associados ao grande deslocamento e contingente populacional decorrente da urbanização descontrolada e não planejada no período pós-guerra e à criação de condições ideais para a proliferação do vetor são alguns dos fatores que explicam em grande parte o aumento dos casos de dengue no mundo na primeira metade do século XX.

A primeira epidemia do vírus dengue nas Américas (DENV-2) foi provavelmente descrita em Cuba no ano de 1891, quando foram registrados milhares de casos hemorrágicos nesse país. Acredita-se que o DENV tenha alcançado Cuba através de embarcações originárias da Ásia, através do transporte de recipientes artificiais acidentalmente infestados com imaturos do mosquito vetor do dengue, o *Aedes aegypti* (Kouri et al. 1986, Ujvari 2003, Martinez 2006). No Brasil, a primeira epidemia que se tem notícia de doença cujos sintomas clínicos se assemelhavam ao dengue parece ter ocorrido em 1846, no Rio de Janeiro, São Paulo e Salvador (Meira 1916). Ao longo da primeira metade do século XX, diversos

surtos semelhantes foram registrados no Brasil, como nas cidades de São Paulo em 1916, Niterói em 1923 e Rio de Janeiro em 1928. Porém, devido a intensiva campanha de controle ao vetor da febre amarela (mesmo vetor do dengue) em meados da década de 50, o vírus se manteve silencioso no Brasil por aproximadamente trinta anos (Meira 1916, Pedro 1923, Franco 1976).

A primeira epidemia de dengue no Brasil provocada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4 foi documentada clínica e laboratorialmente entre os anos de 1981 e 1982 em Boa Vista, Roraima (Osana et al. 1983). Em 1986 o DENV-1 alcançou os Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, no sudeste do país, bem como Alagoas, Ceará, Pernambuco e Bahia, no Nordeste. O DENV-2 foi isolado no Brasil em 1990, no Rio de Janeiro, coincidindo com os primeiros casos graves de dengue hemorrágico. Em 2002 foi identificada a circulação do sorotipo DENV-3 no Rio de Janeiro provocando, até então, a mais severa epidemia de dengue no país, com 696.472 mil casos registrados e 150 óbitos (Braga e Valle 2007a, MS 2017). No ano de 2010, em Roraima e no Amazonas, o DENV-4 foi novamente isolado a partir de casos detectados. No ano seguinte, o Instituto Oswaldo Cruz confirmou os primeiros casos de DENV-4 no Rio de Janeiro (IOC/Fiocruz 2017a). Em 2012, entre os meses de janeiro a abril, houve um predomínio nos isolamentos do sorotipo DENV-4 no país, representando um total de 59,3% do total de 2.098 amostras positivas para o vírus dengue (MS 2012).

De acordo com dados do Ministério da Saúde de 2010, foram registradas no país até quatro grandes epidemias (nos anos de 1998, 2002, 2008 e 2010) em decorrência de mudanças na flutuação do número de humanos suscetíveis a cada um dos quatro sorotipos do dengue (MS 2010, Rodriguez-Barraquer et al. 2011). Desde então, o Brasil vem sofrendo aumento progressivo de casos de dengue.

Em 2015, foram registrados aproximadamente 1,7 milhões de casos de dengue no país, maior número já registrado desde 1990 (MS 2016). O maior número de casos notificados ocorreu na região Sudeste, com mais de um milhão de casos. Em 2016 os registros continuaram alarmantes, com pequena redução dos casos confirmados no país para cerca de 1,6 milhões. Das 1124 amostras isoladas e confirmadas para o dengue, 94,8% foram diagnosticadas com o sorotipo viral DENV-1, mantendo o mesmo predomínio de 2015 (MS 2016). Em 2017, até a Semana Epidemiológica 50 (equivalente ao mês de dezembro), o Ministério da Saúde já havia notificado 249.056 casos prováveis de dengue no Brasil, ainda carecendo de

confirmação. Neste ano, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis, com 34,6 % do observado em todo o Brasil (MS 2017).

Atualmente, a dengue encontra-se distribuída em todos os estados brasileiros. Muito por isso, o número de casos observados no Brasil corresponde a cerca de 60% das notificações registradas nas Américas. Estima-se ainda que ocorram 390 milhões de infecções ao ano no mundo, das quais ao menos 96 milhões apresentam manifestações clínicas e que 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, estão sob risco de contrair o vírus (Bhatt et al. 2013, MS 2016, WHO 2017).

## 1.2 Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um Alphavirus pertencente à família Togaviridae que tem despontado como uma ameaça devido sua natureza altamente debilitante e magnitude sem precedentes (Wahid et al. 2017) (Figura 2). Provavelmente é originário da África Central/Oriental, onde foi encontrado circulando entre mosquitos do gênero *Aedes* e primatas não humanos (Staples et al. 2009, Vega-Rúa et al. 2014). Em 1952, CHIKV foi reportado e identificado pela primeira vez na Tanzânia e, a partir de então, diversos casos foram descritos em outros países do continente africano, como Uganda, Angola, Malawi, Nigéria e Congo, entre os anos de 1960 e 1990 (Wahid et al. 2017).

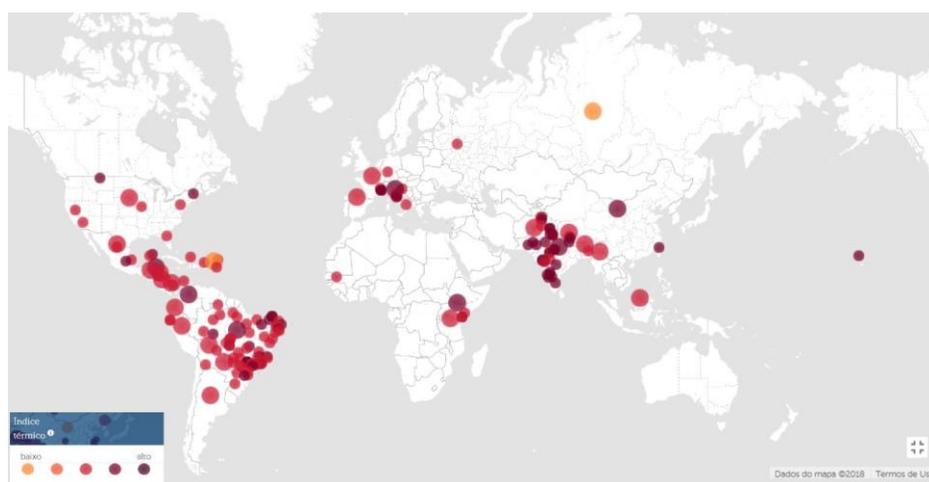


Figura 2: Mapa da distribuição potencial de chikungunya entre setembro de 2017 e março de 2018. Os pontos indicam áreas de alerta conforme registro de casos reportados por organizações de saúde internacionais (Adaptação de: <http://www.healthmap.org/chikungunya/pt/>).

De acordo com análises filogenéticas, CHIKV apresenta quatro linhagens distintas: Asiática, Oeste da África, Leste/Centro/África do Sul (ECSA) e linhagem do Oceano Índico (Wahid et al. 2017). A infecção pelo vírus chikungunya é muitas vezes confundida com a infecção provocada pelo DENV devido à semelhança dos sintomas, porém, a infecção por CHIKV provoca dores muito mais intensas nas articulações e apresenta menor índice de mortalidade.

Nimmannitya e colaboradores documentaram o primeiro grande surto urbano de CHIKV em 1960 em Bangkok, na Ásia, seguidos por casos na Índia a partir de 1963, onde 40% da população foi infectada (Staples et al. 2009, Powers 2018). Surtos de menor intensidade foram relatados nos anos seguintes, mas em 2004, após um grande surto epidêmico no Quênia (com soroprevalência de 70%), que o vírus foi disseminado para ilhas do Oceano Índico (Ilhas Maurícias, Ilhas Seychelles, Comores e La Reunião) (Renault et al. 2012). Em 2013, os primeiros casos de transmissão autóctone nas Américas foram confirmados na parte francesa da ilha caribenha de San Martin. Desde então, a transmissão local foi confirmada em mais de 43 países e territórios da região das Américas cobertos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2016, aproximadamente 150 mil casos de febre Chikungunya nas Américas foram confirmados laboratorialmente e notificados à Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (WHO 2017).

No Brasil, a ocorrência da transmissão autóctone de CHIKV foi relatada, no ano de 2014, nas cidades de Oiapoque e Feira de Santana, estados do Amapá e Bahia, respectivamente. Até outubro de 2014, um total de 828 casos foram registrados no país, sendo apenas 39 oriundos do exterior, principalmente do Haiti e República Dominicana (Donalisio e Freitas 2015). Em 2016, segundo o Ministério da Saúde, foram registrados 277.882 casos prováveis de febre chikungunya. Já em 2017, até a Semana Epidemiológica 50 (1/1/2017 a 16/12/2017), foram registrados 185.605 casos prováveis no país, com 81,4% destes confirmados. A região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis (142.006 casos; 76,5%) em relação ao total do país, seguido pelas regiões Sudeste (23.027 casos; 12,4%), Norte (16.564 casos; 8,9%), Centro-Oeste (3.648 casos; 2%) e Sul (360 casos; 0,2%) (MS 2017).

### 1.3 Zika

Zika vírus (ZIKV) é um vírus do gênero *Flavivirus*, família *Faviridae*, que apresenta similaridade genética com os vírus da dengue, febre amarela, oeste do Nilo e encefalite japonesa. Este vírus vem se destacando no cenário epidemiológico desde 2007, em decorrência dos numerosos surtos na África, Ásia e mais recentemente nas Américas, onde se tornou um grave problema de saúde pública (Weaver et al. 2016) (Figura 3).

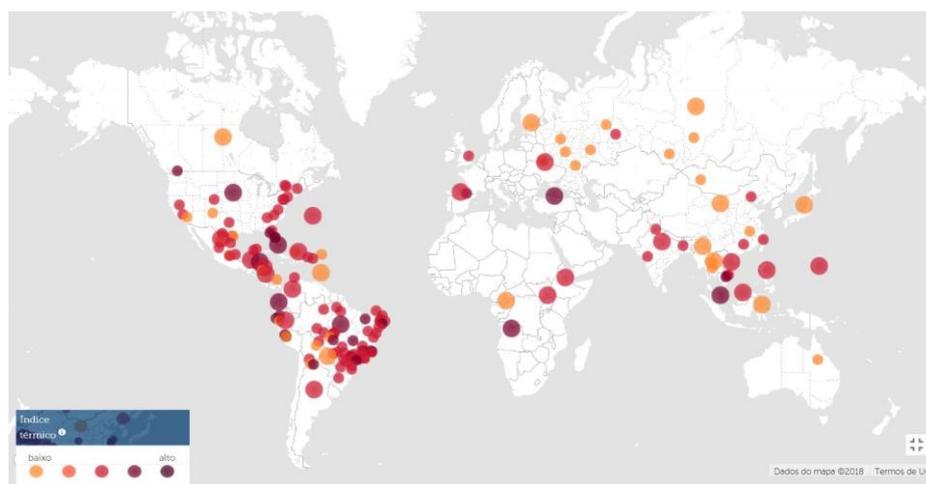


Figura 3: Mapa da distribuição potencial de Zika entre setembro de 2017 e março de 2018. Os pontos indicam áreas de alerta conforme registro de casos reportados por organizações de saúde internacionais (Adaptação de: <http://www.healthmap.org/zika/pt/>).

Foi descoberto pela Fundação Rockefeller em 1947, quando investigavam algumas arboviroses como a febre amarela utilizando macacos *Rhesus* como sentinelas na floresta Zika, em Uganda. Alguns macacos apresentaram sintomatologia febril e tiveram isolados de um vírus até então desconhecido. No ano seguinte conseguiram isolar o mesmo vírus de mosquitos adultos da espécie *Ae. africanus* coletados na mesma localidade. A primeira caracterização da doença em humanos só ocorreu em 1954 na Nigéria (Dick et al. 1952, Macnamara 1954).

No continente asiático, a primeira detecção e evidência de transmissão do ZIKV pelo *Ae. aegypti* aconteceu no ano de 1966, na Malásia. Em 1977, a primeira infecção humana foi registrada na ilha de Java, na Indonésia. Em 2007, a primeira grande infecção com ZIKV foi detectada nas ilhas Yap, na Micronésia, onde estimativas apontam que cerca de 73% da população pode ter sido infectada pelo vírus. Nesse mesmo ano um surto no Gabão já havia sido relatado, porém com

menor prevalência (Duffy et al. 2009, Grard et al. 2014). Possivelmente, em decorrência desses surtos, o ZIKV conseguiu se disseminar e chegar ao Pacífico Sul provocando uma grande epidemia na Polinésia Francesa em 2013, com 66% da população considerada infectada (Cauchemez et al. 2016, Guerbois et al. 2016).

Até 2014, a circulação de ZIKV no hemisfério ocidental era considerada inexistente. Entretanto, análises filogenéticas sugerem a introdução do vírus no Brasil em 2014, possivelmente pela ocorrência da Copa do Mundo de futebol realizada entre os meses de Junho/Julho desse mesmo ano. Outra teoria sugere que a introdução do vírus se deu pelo advento do Campeonato Mundial de Canoagem Sprint, também ocorrido em 2014, com a participação de atletas oriundos de países do Pacífico que registraram a circulação do ZIKV. Apesar das diferentes hipóteses, o advento da Copa do Mundo em 2014 é o mais plausível, considerando a disseminação inicial do ZIKV no Nordeste do Brasil, a partir das cidades de realização do evento: Natal, Recife, Salvador e / ou Fortaleza (Musso e Gluber 2016, Zanluca et al. 2015, Weaver et al. 2016).

A partir de 2015 começaram a surgir os primeiros casos da doença nos estados do Rio Grande do Norte, Bahia e Rio de Janeiro (Campos et al. 2015, Zanluca et al. 2015, Ferreira-de-Brito et al. 2016). O vírus disseminou-se rapidamente, sendo identificado e confirmado casos autóctones nas cinco regiões do país já no final de 2015. Provavelmente, o ZIKV continuou se espalhando pelas Américas a partir do Brasil, sendo que 48 países e territórios nas Américas já confirmaram a transmissão autóctone desse vírus (PAHO 2017).

Por sua grande associação com os casos graves de microcefalia em neonatos e com a Síndrome de Guillain-Barré, independentemente da idade e gênero, a febre pelo vírus Zika passou a ser considerada doença de notificação compulsória, presente na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública desde 2016. De acordo com Ministério da Saúde, em 2016 foram registrados 216.207 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no Brasil, com um total de 8 óbitos confirmados nos estados do Rio de Janeiro (4), Espírito Santo (2), Maranhão (1) e Paraíba (1). Em 2017, até a Semana Epidemiológica 50, foram registrados 17.338 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, com maior incidência nas regiões Centro Oeste e Norte (MS 2017). Um menor número de indivíduos suscetíveis ao ZIKV, ou mesmo uma maior circulação de outra arbovirose como a dengue, por exemplo, são possíveis explicações para essa consistente redução de casos registrados entre estes dois últimos anos.

O agravamento do cenário epidemiológico no que diz respeito ao ZIKV desencadeou um aumento de pesquisas sobre o vírus e sua interação com o hospedeiro, assim como as formas de transmissão que extrapolam a via por mosquitos. A transmissão sexual, perinatal e transfusão sanguínea são algumas das vias já reportadas para a transmissão do ZIKV (Besnard et al. 2014, Marano et al. 2015, Franchini e Velati 2015, McCarthy 2016a, McCarthy 2016b).

#### **1.4 Biologia do *Aedes aegypti*: aspectos básicos**

O *Aedes aegypti*, mosquito pertencente à ordem Diptera da família Culicidae, encontra-se disseminado pelo mundo nas zonas tropicais e subtropicais, sendo nas Américas o único vetor natural incriminado do vírus dengue e apresentando diversas populações naturais altamente susceptíveis a este vírus, assim como os da febre amarela, Chikungunya e Zika (Lourenço-de-Oliveira et al. 2004, Vega-Rúa et al. 2014, Chouin-Carneiro et al. 2016, Ferreira-de-Brito et al. 2016).

Espécie de origem africana, sua entrada no Brasil e em outros países das Américas se deu provavelmente durante o período colonial, com a chegada de navios negreiros e as explorações europeias ao Novo Mundo (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). No final da década de 1950, o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado no Brasil em decorrência do extensivo combate à Febre Amarela iniciado por Oswaldo Cruz e seguido pela Fundação Rockefeller. Entretanto, em meados da década de 1970, uma nova infestação iniciou-se e os esforços para a erradicação do mosquito não foram mais suficientes para eliminá-lo do território brasileiro (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

*Aedes aegypti* está intimamente associado aos seres humanos e é encontrado principalmente nas áreas urbanas de regiões metropolitanas (Braks et al. 2003). Possui comportamento antropofílico e endofílico, realizando o repasto sanguíneo e o repouso no interior de habitações, especialmente nas primeiras horas da manhã e ao entardecer (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). A alimentação sanguínea é restrita às fêmeas adultas, as quais, através da picada, obtêm o sangue para maturação de seus ovários (Lea 1956). A hematofagia em humanos portadores de uma dada arbovirose é a principal via de infecção dos mosquitos. Quando cada oviposição é decorrente de apenas um repasto sanguíneo, então falamos em concordância gonotrófica. Entretanto, com frequência, múltiplos repastos sanguíneos são necessários pelas fêmeas em cada ciclo gonotrófico (período em

dias compreendido entre a alimentação sanguínea e a postura dos ovos decorrentes dessa alimentação) no mesmo ou em outro hospedeiro, sobretudo quando das diversas tentativas interrompidas durante o processo. Neste caso, nos referimos a um ciclo gonotrófico com discordância gonotrófica. Tal comportamento favorece a disseminação do vírus entre hospedeiros susceptíveis, tendo em vista o maior contato entre vetor e hospedeiro (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Halstead 2008).

Cerca de 3 a 5 dias após a alimentação sanguínea, a fêmea de *Ae. aegypti* encontra-se apta para realização da postura de seus ovos. As fêmeas têm preferência por criadouros artificiais do ambiente urbano que acumulem água limpa, pouca matéria orgânica e apresentem baixa turbidez, localizados nos arredores das habitações humanas como pneus, caixas d'água, toneis, pratos de planta e ralos (Cunha et al. 2002, Maciel-de-Freitas et al. 2007, David et al. 2009). Apesar da preferência por criadouros artificiais, eventualmente ovos e imaturos do *Aedes aegypti* podem ser encontrados em ambiente naturais como vãos de rochas, cascas de frutas, internódios de bambus, axilas ou tanques de bromélias (Forattini e Marques 2000, Varejão et al. 2005, Paupy et al. 2008). Um comportamento observado entre as fêmeas de *Ae. aegypti* é a chamada “oviposição em saltos” (do termo inglês *skip oviposition*), onde os ovos são depositados em múltiplos criadouros. Possivelmente, tal comportamento seja uma estratégia evolutiva para evitar a quantidade exacerbada de imaturos em criadouros com limitada fonte alimentar e a redução das ameaças dos criadouros temporários (Reiter 2007).

*Aedes aegypti* é um inseto holometábolo que, após eclosão do ovo, o qual é resistente à dessecação e pode manter-se viável em ambientes ausentes de água por até um ano (Forattini 1996), apresenta quatro estágios larvais de ciclo aquático (Figura 4). Nessa fase do ciclo de vida, as larvas alimentam-se de material orgânico contido no criadouro, por vezes recorrendo ao canibalismo na ausência de recursos. Na fase seguinte que é o estágio de pupa, não há mais alimentação e o inseto aguarda a metamorfose e a emersão do mosquito adulto, o qual estabelecerá seu ciclo terrestre (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Farnesi et al. 2015).

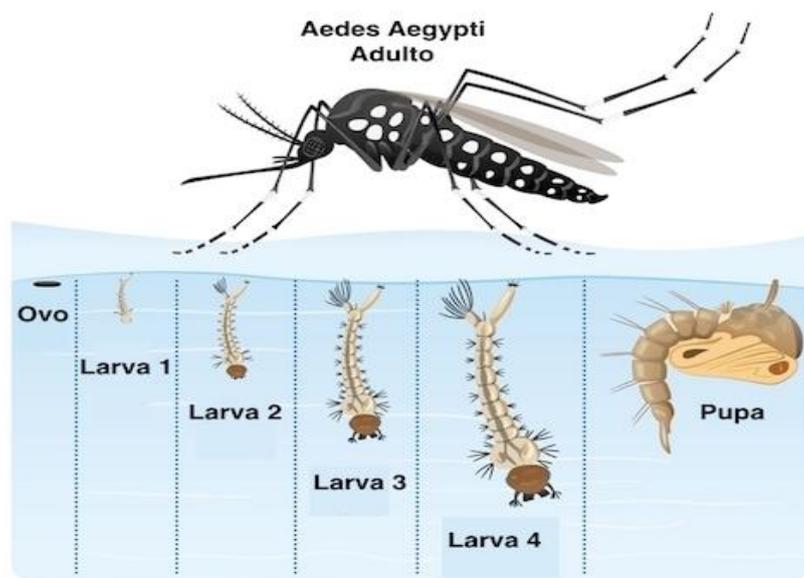


Figura 4: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (adaptação de <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/>).

## 1.5 Controle Vetorial

A manutenção do tamanho populacional de mosquitos a níveis inferiores a um limite teórico de transmissão de um arbovírus é a coluna dorsal das atividades de controle vetorial que visam mitigar surtos epidêmicos (Focks 2003). Ainda não estão disponíveis em larga escala vacinas eficazes ou drogas específicas para bloquear as manifestações clínicas das principais arboviroses (DENV, ZIKV e CHIKV). Assim, o controle do *Aedes aegypti* é o principal foco das metodologias de controle dessas doenças (San Martin et al. 2010). Até o presente momento, o combate ao *Ae. aegypti*, seja em sua forma imatura ou alada, pode ser feito majoritariamente por meio de abordagens mecânicas, biológicas ou químicas (MS 2014).

### 1.5.1 Controle mecânico/físico

A eliminação de criadouros e/ou a vedação destes para impedir o acesso das fêmeas à coleção hídrica são as ações mais visadas do controle mecânico (Rozendal 1997). A utilização de telas em portas e janelas, bem como de mosquiteiros impregnados com inseticida de longa duração (MILDs), também são muito eficientes para reduzir a exposição às picadas de mosquitos vetores (Binka et al. 1998). Os MILDs são amplamente empregados para controle da malária e o impacto desses mosquiteiros no controle dessa doença tem sido especialmente

importante em localidades onde há evidências epidemiológicas e/ou entomológicas de transmissão intradomiciliar (Brasil 2009). Eles representam não somente uma barreira física, mas também química, levando à morte do vetor em algumas horas após o contato com o mosquito. O aprimoramento das condições sanitárias também contribui para a redução do contato entre o homem e o mosquito e, conseqüentemente, a emergência de epidemias. Vale destacar que esse tipo de intervenção é laborioso, intenso e dependente de planejamento governamental, qualidade do serviço do agente de saúde em campo, colaboração da população e ações educativas para manutenção da eficácia da estratégia em médio prazo (Morrison et al. 2008).

Um excelente exemplo de mobilização por parte do Instituto Oswaldo Cruz, em conjunto com a Secretaria do Estado de Saúde do Rio de Janeiro, é a campanha “10 Minutos Contra o *Aedes*”. Lançado em 2011, seu objetivo é promover a ação da população na identificação, limpeza e/ou eliminação dos principais criadouros do *Aedes aegypti* dentro de seus domicílios (IOC/Fiocruz 2017). Essa proposta foi inspirada em um programa de controle nacional empregado em Cingapura na década de 1960. Na ocasião, a implementação deste programa resultou em um decréscimo considerável na incidência de dengue, que coincidiu com uma redução acima de 25% no índice geral de infestação do *Aedes* por casa (Burattini et al. 2007).

### **1.5.2 Controle químico**

O controle químico realizado através da utilização de inseticidas, substâncias de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais empregadas que visam a eliminação ou redução da população do inseto vetor alvo.

Durante a Segunda Guerra Mundial foi desenvolvido o primeiro inseticida de efeito prolongado, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), o qual perdurava ativamente por vários meses contra os insetos (Braga e Valle 2007a). Atualmente os inseticidas atuam em duas linhas de ação: comprometendo o Sistema Nervoso Central ou agindo como regulador do crescimento de insetos (OMS 2009). Quatro principais classes de inseticidas atuam como neurotóxicos: organoclorados, carbamatos, organofosforados e piretróides. Estes compostos agem em diferentes moléculas do Sistema Nervoso Central do inseto provocando exacerbação dos impulsos elétricos, contrações rápidas e repetitivas na musculatura, resultando em paralisia e morte (Beaty e Marquardt 1996, Ware e Whitacre 2004, Braga e Valle 2007b). Esse tipo de controle pode ser bastante efetivo. Entretanto, quando aplicado de maneira

desordenada, favorece a disseminação de alelos de resistência aos inseticidas, fato já visto em diversas populações naturais brasileiras (Denholm et al. 2002, Montella et al. 2007, Linss et al. 2014).

Em contrapartida, os reguladores de crescimento de insetos ou IGR (*Insect Growth Regulator*) funcionam de forma vagarosa causando modificações morfológicas e fisiológicas, interferindo na ecdise, metamorfose, reprodução e desenvolvimento ovariano do inseto. No grupo dos IGRs encontram-se os inibidores de síntese de quitina como diflubenzuron e novaluron que, apesar de eficazes, não são recomendados para aplicação em água potável, restringindo seu uso em áreas cujos criadouros predominantes são recipientes de abastecimento de água para consumo humano. Os análogos de hormônio juvenil como o pyriproxifen e methoprene também compõem o grupo dos IGRs. Apesar de já ter sido observada a resistência em linhagens de *Anopheles gambiae* e *Aedes taeniorhynchus* ao methoprene, todas as populações de *Ae. aegypti* até então estudadas, oriundas de vários locais do Brasil, demonstraram ser susceptíveis a esse IGR (Fournet et al. 1997, Chavasse e Yap 1997, Braga e Valle 2007c).

### **1.5.3 Controle biológico**

O controle biológico de mosquitos vetores ocorre pela utilização de organismos tais como peixes, protozoários, bactérias, fungos, crustáceos e até outros insetos atuando, como predadores, parasitas ou organismos patogênicos (Rozendal 1997). Costuma possuir maior aceitabilidade por ser apresentado como uma estratégia positiva para o meio ambiente (Rozendal 1997).

A bactéria *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti) é um dos organismos mais utilizados nesse método de controle. Os esporos desta bactéria apresentam cristais que produzem pró-toxinas nocivas às formas imaturas do mosquito quando ingeridas por este. Por não apresentar, até o momento, sinais de seleção de resistência, é útil em populações com elevada resistência aos inseticidas químicos, embora apresente menor estabilidade em condições de alta temperatura (Rozendal 1997, Braga e Valle 2007b).

Apesar de ambientalmente aceitável e, em alguns casos, recomendado pela Organização Mundial da Saúde, o controle biológico em larga escala é por vezes inexecutável por conta da produção, manutenção e distribuição do organismo que executará o controle. Além disso, é necessário conhecimento prévio dos aspectos

biológicos não somente da espécie alvo, como também daquela pretendida para controlar a população vetora (Rozendal 1997).

## **1.6 Alternativas de controle**

A utilização de penas um método de controle não parece ser capaz de mitigar a morbidade e mortalidade por doenças associadas aos arbovírus. Ademais, mesmo com a integração das abordagens clássicas para uma maior eficiência, a redução da densidade de populações de *Ae. aegypti* constitui-se um grande desafio para a saúde pública. Nesse contexto, diversas metodologias promissoras de controle têm sido desenvolvidas. Estas podem utilizar novos agentes biológicos de controle, mosquitos geneticamente modificados ou até o próprio vetor como dispersor de inseticidas (Araújo et al. 2015, Abad-Franch et al. 2017, Garcia 2017).

### **1.6.1 Mosquitos transgênicos**

A manipulação genética para supressão ou substituição de populações de mosquitos vem se destacando, majoritariamente, pelo desenvolvimento da técnica RIDL (*Release of Insects containing Dominant Lethal gene*). Através da liberação de machos com a inserção de um gene letal, toda a prole oriunda do cruzamento destes com fêmeas selvagens morre (Thomas et al. 2000). Para a criação dessa linhagem de mosquitos em laboratório, é necessária a utilização da tetraciclina que atua impedindo a expressão do gene ativador. Na ausência do inibidor, o gene ativador induz a expressão do efector, levando o inseto à morte em determinada fase da vida, seja no estágio de pupa ou no estágio adulto (Phuc et al. 2007, Bargielowski et al. 2011).

No Brasil, a linhagem OX513A de *Aedes aegypti*, produzida pela Oxitec, recebeu aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para implementação da metodologia em municípios dos estados da Bahia e São Paulo (Oliveira et al. 2011, Carvalho et al. 2015). A proposta é reduzir o tamanho populacional de *Ae. aegypti* drasticamente, após sucessivas liberações de mosquitos transgênicos. Entretanto, para o êxito em longo prazo, são necessárias liberações sucessivas dos machos, configurando uma desvantagem dessa estratégia (Zara et al. 2016). Garziera e colaboradores (2017) demonstraram que nos municípios de Juazeiro e Jacobina, no estado da Bahia, houve uma supressão média de cerca de 70% da população selvagem após soltura de machos

transgênicos. Em Juazeiro, o número de ovos coletados por armadilha após a fase de liberação variou entre 0,06 e 14,41 e essa supressão permaneceu por 17 semanas após a interrupção das solturas. Já em Jacobina, a população de mosquitos permaneceu suprimida por 32 semanas e o número de ovos por armadilha variou entre 1 e 7,2. Apesar desses resultados, o número de ovos coletados aumentou 4-5 meses após a interrupção das solturas, sinalizando o restabelecimento da população de *Ae. aegypti* após a interrupção dos lançamentos.

### **1.6.2 *Wolbachia***

A *Wolbachia* é uma bactéria simbiote intracelular obrigatória capaz de infectar naturalmente 60-70% dos insetos entre coleópteros, dípteros e lepidópteros (Werren et al 2008). Também é encontrado em outros grupos de artrópodes e nematoides (Bandi et al. 2001, Gotoh et al. 2003, Breeuwer e Jacobs 1996). Apesar dessa considerável distribuição entre os insetos, essa bactéria não é naturalmente encontrada no mosquito *Ae. aegypti*.

Estudos com moscas da espécie *Drosophila melanogaster* demonstraram que a infecção com *Wolbachia* provocava redução da longevidade (Min e Benzer 1997, Hedges et al. 2008, Teixeira et al. 2008, Mcmeniman et al. 2009). A partir dessas observações buscou-se a microinjeção desta bactéria em ovos de *Ae. aegypti*, a princípio, para promover a diminuição do tempo de vida do inseto, permitindo que um menor número de mosquitos sobrevivesse ao período de incubação extrínseco do vírus dengue e, conseqüentemente, estivessem aptos a transmiti-lo (McMeniman et al. 2009). Posteriormente, descobriu-se que a infecção de *Drosophila* com *Wolbachia* protegia as moscas contra uma série de vírus de RNA (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Logo, conjecturou-se que os efeitos causados pela infecção por *Wolbachia* reduziria a capacidade vetorial dos mosquitos de importância médica, limitando assim a transmissão de arbovírus em campo. Como resultado dessas pesquisas, constatou-se que a bactéria bloqueava o vírus dengue, chikungunya e *Plasmodium gallinaceum* (agente etiológico da malária das aves) nos mosquitos, enquanto aqueles livres de *Wolbachia* apresentavam grande competência vetorial a estes patógenos (Moreira et al. 2009). Estudos subsequentes demonstraram que a presença da *Wolbachia* também bloqueava a replicação e transmissão de patógenos por *Ae. aegypti*, incluindo o vírus da febre amarela, ZIKV e Chikungunya em níveis mais elevados que os observados para DENV (Walker et al. 2011, Aliota et al. 2016, Caragata et al. 2016, Dutra et al. 2016).

Em muitos insetos, inclusive nos mosquitos, a *Wolbachia* é capaz de manipular a biologia reprodutiva do hospedeiro provocando um fenômeno conhecido como incompatibilidade citoplasmática (IC), que impede a produção de prole viável após cópula entre fêmeas sem *Wolbachia* e machos infectados pela bactéria. Em contrapartida, fêmeas infectadas com *Wolbachia* podem ser inseminadas tanto por macho contendo ou não a bactéria, pois em ambos os casos as fêmeas farão a postura de ovos viáveis e 100% infectados. Como a *Wolbachia* é transmitida maternalmente, e com a ajuda da incompatibilidade citoplasmática, ela é capaz de substituir a população selvagem, que apresenta elevada competência vetorial, por uma população de mosquitos com susceptibilidade reduzida a arbovírus por conta do fenótipo de bloqueio (Xi et al. 2005, Walker et al. 2011).

Os primeiros passos da utilização da *Wolbachia* em campo como biocontrole de arboviroses se deram a partir da criação do “*Eliminate Dengue Program*” pela Universidade Monash da Austrália em parceria com a Fundação Bill & Melinda Gates. Mosquitos *Ae. aegypti* infectados com a cepa wMel foram liberados em duas localidades próximas a Cairns, Austrália e, após 12 semanas, a frequência de infecção por *Wolbachia* nessas áreas atingiu valor superior a 90%, mantendo-se assim por mais de três anos (Hoffmann et al. 2011, Frentiu et al. 2014). Por esses resultados, o programa “*Eliminate Dengue*” foi expandido para alguns países endêmicos de dengue, como Indonésia, Vietnã, Colômbia e Brasil (Maciel-de-Freitas et al. 2012).

O cerne da metodologia é engendrar a substituição da população selvagem de *Ae. aegypti* altamente competente aos arbovírus DENV, CHIK e ZIKV por uma população com *Wolbachia*, incapaz de efetuar a transmissão. Para isso, são liberados milhares de mosquitos semanalmente que, fazendo uso do fenômeno de incompatibilidade citoplasmática completa e alta transmissão materna, alcançam esta substituição em cerca de 15-20 semanas. Em linhas gerais, essa estratégia é considerada bem sucedida quando há manutenção estável de mosquitos infectados com *Wolbachia* em frequência elevada em campo, principalmente no período pós-soltura, quando as liberações semanais não mais acrescentam novos mosquitos com *Wolbachia* à área de estudo. Vale ressaltar que essa estratégia é considerada autossustentável, pois, uma vez estabelecida a substituição populacional dos mosquitos, não há necessidade de novas solturas, promovendo proteção contínua contra arboviroses (Zara et al. 2016).

O projeto foi trazido ao Brasil pela Fundação Oswaldo Cruz e os ensaios com liberação de *Wolbachia* iniciaram-se em 2014. Inicialmente, mosquitos brasileiros foram obtidos a partir de milhares de ovos coletados em ovitrampas instaladas no bairro de Vila Valqueire, no município do Rio de Janeiro em 2012. Fêmeas de *Ae. aegypti* australianas infectadas com a cepa wMel foram cruzadas com mosquitos machos brasileiros para a obtenção da cepa wMelBr, uma linhagem infectada com *Wolbachia*, porém, com um background genético brasileiro. Para grupo controle, utilizou-se a linhagem wMelTet que foi constituída de mosquitos retrocruzados tratados com antibiótico tetraciclina (Dutra 2014).

As liberações de mosquitos infectados com wMelBr ocorreram ao longo de 20 semanas consecutivas no bairro de Tubiacanga (22°47'06"S;43°13'32"W), localizado no município do Rio de Janeiro. Em cada soltura realizada sempre nas primeiras horas da manhã, 50 mosquitos de 4-6 dias de vida eram liberados a cada quatro casas. Ao longo do tempo o número total de mosquitos liberados aumentou, começando com 7500 na semana um e terminando com 15000 na semana 20 (Garcia 2017).

À medida que as liberações ocorriam, a taxa de invasão da *Wolbachia* aumentava, atingindo um pico de 65% na última semana de soltura. Entretanto, cinco semanas após o término das solturas esse percentual caiu drasticamente para apenas 20% e assim permaneceu. A partir dessas observações, uma série de investigações foram conduzidas para tentar entender o porquê a *Wolbachia* não foi capaz de se disseminar em campo como visto em outros países. Após testar diferentes hipóteses que explicassem a falha na invasão da *Wolbachia*, como por exemplo um número insuficiente de mosquitos liberados, fitness comprometido e transmissão materna incompleta, descobriu-se que a baixa frequência de alelos de resistência (*kdr*) a piretróides na linhagem wMelBr, diferentemente da população selvagem, altamente resistente aos inseticidas, associada à utilização doméstica exacerbada de inseticidas pelos moradores da localidade após as liberações, foram os principais motivos para impedir a invasão bem sucedida da bactéria neste primeiro momento (Garcia et al. 2017).

Com o intuito de solucionar esse problema, uma segunda cepa, a wMelRio, foi criada com frequências alélicas de *kdr* semelhantes aos mosquitos nativos do Rio e novas liberações ocorreram em Tubiacanga e em Jurujuba, município de Niterói, também no estado do Rio de Janeiro ao longo de 2015 e 2016. Um ano após o fim das liberações, a frequência de *Wolbachia* permaneceu entre 85-95% em ambas as

localidades (Garcia et al. 2017). Até o final de 2018, o projeto Eliminar a Dengue Brasil intenta alcançar 88 bairros no Rio de Janeiro e 28 bairros em Niterói ([www.eliminatedengue.com](http://www.eliminatedengue.com)).

## **1.7 Armadilhas e monitoramento entomológico**

Inúmeros são os métodos de captura e monitoramento de vetores nos programas de vigilância entomológica. As armadilhas têm papel majoritário no monitoramento do tamanho da população de adultos, cujo objetivo principal é direcionar atividades de controle, tais como redução de criadouros e/ou aplicação de inseticidas, para áreas onde fêmeas adultas do vetor tenham sido capturadas com maior frequência (Maciel-de-Freitas 2010).

Até o final da década de 80 as armadilhas para coleta de mosquitos adultos eram utilizadas apenas para avaliar sua eficácia em programas de controle de mosquitos em geral. A armadilha luminosa New Jersey e a CDC (*Centers of Disease Control*) eram as únicas existentes até então (Degener 2014). A partir 1995, diversas empresas passaram a desenvolver armadilhas projetadas para capturar *Ae. aegypti*, hoje disponíveis no mercado (Kline 2006), como é o caso das armadilhas Adultrap, Mosquitrap e Biogents-Sentinel, responsáveis pela captura de fêmeas adultas que procuram sítios de postura ou hospedeiros humanos como fonte de alimentação sanguínea (Codeço et al. 2015).

No caso da *Wolbachia*, para monitorar a população do *Ae. aegypti*, bem como acompanhar a taxa de invasão da bactéria em questão, as armadilhas são os principais meios de coletas de amostras. Semelhante a países como Austrália e Vietnã, a BG-Sentinel é a principal armadilha para coleta de *Ae. aegypti* no Brasil para estimar a frequência de *Wolbachia* em campo. Outra armadilha que vem sendo utilizada e estudada como recurso para monitoramento da *Wolbachia* é a ovitrampa, armadilha específica para captura de ovos (Hoffmann et al. 2011, Nguyen et al. 2015).

### **1.7.1 Biogents-Sentinel**

A Biogents-Sentinel® (BG-Sentinel, BGS) é uma armadilha que foi desenvolvida originalmente para o monitoramento de *Ae. aegypti* pela Universidade de Regensburg e é comercializada pela Biogents SA, empresa pertencente a mesma Instituição (Degener 2014). A BGS captura predominantemente fêmeas

adultas em busca de repasto sanguíneo, uma vez que possui atraente que simula o odor humano (maiores detalhes abaixo) (Geier et al. 1999, Bosch et al 2000).

Estruturalmente, a BGS é um recipiente de tecido desmontável com 36cm de diâmetro, 40cm de altura e uma tampa branca com orifícios cobrindo a abertura. No meio da tampa da gaze, o ar é aspirado para a armadilha através de um tubo de retenção preto, por um ventilador elétrico de corrente contínua situado na parte inferior (Figura 5). Por isso, há a necessidade de plugar essa armadilha na rede elétrica de residências, fato que pode se tornar um limitante para o uso desta armadilha em decorrência do uso de energia de moradores em áreas de baixo desenvolvimento socioeconômico. Através da imitação do odor humano, expelido através de correntes de convecção, a BGS atrai os mosquitos via estímulos visuais além de exalar uma mistura constituída por ácido láctico, amônia e ácido capróico, simulando assim o odor humano atraente para os mosquitos (Geier et al. 1999, Bosch et al. 2000). Essa mistura é emitida pela BG-Lure que é um liberador olfativo duradouro localizado no interior da armadilha (Kröckel et al. 2006).



Figura 5: BG-Sentinel. Setas amarelas indicam a sucção pelo funil preto e setas vermelhas indicam a liberação da corrente de convecção de ar. (Fonte: [www.bg-sentinel.com](http://www.bg-sentinel.com)).

Diversos estudos realizados já demonstraram que a BGS é altamente eficiente na captura de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*. Além de fêmeas à

procura de uma alimentação sanguínea e em diferentes fases do desenvolvimento ovariano, machos desses mosquitos também podem ser capturados pela armadilha, pois a princípio estão à procura de fêmeas e por acaso acabam capturados pela armadilha em igual proporção (Maciel-de-Freitas et al. 2006, Williams et al. 2006, Englbrecht et al. 2009, Ritchie et al. 2013, Villela et al. 2015).

### **1.7.2 Ovitampa**

A ovitampa é uma clássica armadilha concebida em 1965 para atrair fêmeas em busca de lugares para oviposição e recolher ovos, além de ser empregada em muitos países juntamente com rotina de pesquisas larvais. Consiste em um recipiente plástico preto e uma palheta de madeira fixada no interior (Figura 6), podendo usar uma infusão de feno como atraente (Fay e Eliason 1966, Codeço et al. 2015).



Figura 6: Ovitampa com água e palheta para coleta de ovos.

Amplamente explorada pelas administrações públicas para avaliar a abundância de espécies, a ovitampa é utilizada pelo Programa Nacional de Controle da Dengue e considerada muito eficiente por sua elevada sensibilidade à presença dos mosquitos durante o ano inteiro, mesmo quando os níveis de infestação são baixos, não só durante as chuvas, mas também no período da seca. Ao atrair a fêmea grávida, diminui a possibilidade da oviposição nos outros sítios disponíveis (Gomes 1998, Focks 2003, Degener 2014, Codeço et al. 2015).

Pesquisas envolvendo liberações de populações de mosquitos com *Wolbachia* têm empregado a ovitrampa como uma alternativa secundária às BGS para monitoramento da invasão da bactéria em campo, demonstrando certa viabilidade e sensibilidade da armadilha para essa finalidade (Hoffmann et al. 2011, Nguyen et al. 2015, Dutra et al. 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, durante os ensaios em campo com *Wolbachia* no bairro de Tubiacanga, concomitantemente com as BGS, foram instaladas ovitrampas para captura de ovos e posterior análise para detecção da *Wolbachia*. Após comparações entre as curvas de invasão da bactéria através da coleta de adultos por 30 BGs-Sentinelas e de uma amostragem de larvas provenientes de 45 ovitrampas (Figura 7), considerou-se que ovitrampas podem ser excelentes instrumentos de monitoramento da invasão da *Wolbachia* em campo devido à grande sobreposição entre os métodos.

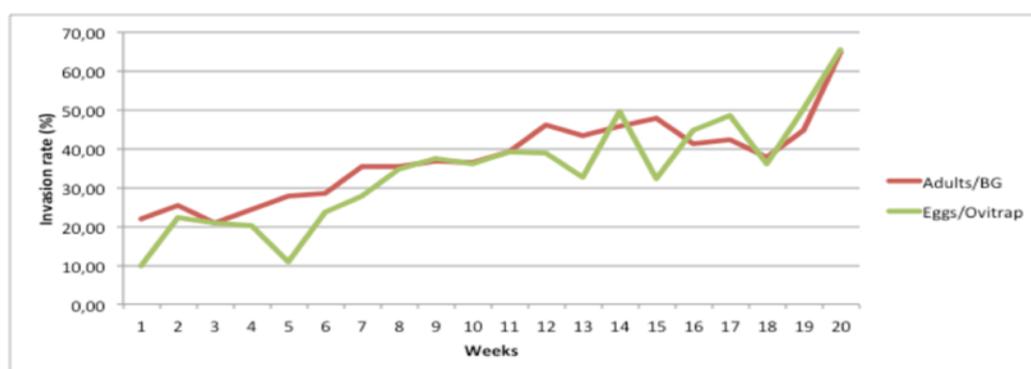


Figura 7: Curva de invasão da *Wolbachia* através de BG-Sentinelas e ovitrampas durante período de liberação de mosquitos infectados com a bactéria em Tubiacanga.

É importante ressaltar que todos os adultos coletados na BG-Sentinela foram analisados individualmente, enquanto que nas ovitrampas avaliou-se individualmente uma amostragem de aproximadamente 10-15% das larvas coletadas. Se, em uma ovitrampa, até 20 larvas fossem obtidas cinco dias após a eclosão dos ovos, todas as larvas eram individualmente analisadas via qRT-PCR para presença de *Wolbachia*. Se tivéssemos entre 21 e 300 larvas, 20 eram aleatoriamente selecionadas para *screening*. Entre 301 e 500 larvas, 30 eram separadas e por fim, se mais de 500 larvas fossem encontradas por ovitrampa, 50 destas eram separadas para *screening*. Assim, analisando a Figura 7, fica evidente que uma amostragem de larvas gerou estimativas muito aproximadas à da totalidade dos adultos coletados. Deve-se considerar que o tamanho da população selvagem é desconhecido e não existem métodos infalíveis para estimar a densidade

populacional de mosquitos em campo (Villela et al. 2015, Garcia et al. 2016, Villela et al. 2017).

Apesar de sua importante utilização, a BG-Sentinela pode ser considerada onerosa quando pretendida para utilização em larga escala no campo, tendo em vista o alto custo de importação, dependência de energia elétrica para manter ativa a ventoinha responsável pela sucção dos mosquitos, gastos com atraentes químicos, além de requerer um maior espaço para instalação devido ao seu tamanho relativamente grande. Estima-se que uma BG-Sentinela custe R\$600,00 reais. Em outra via, a ovitrampa é considerada muito eficiente, altamente sensível para detecção de *Ae. aegypti* e largamente utilizada, mesmo apresentando desvantagens em detrimento do tempo gasto desde a contagem dos ovos até eclosão para identificação em nível de espécie. Nesse contexto, a utilização da ovitrampa pode ser mais vantajosa que a armadilha BG-Sentinela considerando-se o custo-benefício de ambas as armadilhas, já que essa é menos onerosa tanto para instalação quanto manutenção, pouco espaçosa, pode ser utilizada em grande número numa dada área e ainda é habitual aos agentes de saúde.

Uma vez que o cenário descrito aponta as ovitrampas com potencial para serem consideravelmente mais vantajosas que as BG-Sentinelas em campo devido ao seu baixo custo, pretendemos avaliar os prós e contras de sua utilização para monitoramento da frequência de *Wolbachia* em populações naturais de *Ae. aegypti*. Fez-se isso através da liberação de quantidade conhecida de mosquitos com e sem *Wolbachia* num ambiente simulado de campo. Desta maneira, pudemos saber o percentual de amostras por ovitrampas a ser analisado em cada momento da curva de invasão, para avaliar o potencial dessa armadilha em estimar a invasão da *Wolbachia*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a acurácia da ovitrampa como método alternativo para estimar a invasão da *Wolbachia* em populações naturais de *Aedes aegypti*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Estimar o potencial da ovitrampa em determinar a frequência de *Wolbachia* tendo densidades conhecidas de mosquitos adultos em experimentos em Simulado de Campo;

Estabelecer via simulações, qual o percentual das amostras coletadas em cada tratamento que deve passar por *screening* individual para ter estimativas com baixo erro amostral na frequência de *Wolbachia*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo – Simulado de Campo

O Simulado de Campo encontra-se localizado na expansão do campus da Fiocruz no Rio de Janeiro (22°52'42"S, 43°14'25"W). Possui laje de concreto com ralos para escoar água de chuva, e estrutura aramada em sua extensão lateral e porção apical, totalizando 176 m<sup>2</sup> para simular o ambiente externo (Figura 8a). Possui três divisórias internas, permitindo que sejam confeccionados quatro espaços menores com 44 m<sup>2</sup> cada (Figura 8b). Importante salientar que o Simulado de Campo não possui controle de temperatura, estando exposto a variações climáticas similares ao ambiente externo.



Figura 8: Simulado de Campo - área externa (a); área interna (b).

Nos ensaios conduzidos no Simulado de Campo, novas divisórias teladas foram acrescentadas, resultando na liberação de uma quantidade conhecida de fêmeas de *Ae. aegypti* em espaços de 20m<sup>2</sup>. Esse espaço pode ser considerado como semelhante ao observado em áreas com baixo poder socioeconômico, típico de favelas brasileiras em áreas com elevada demografia. Cada um desses espaços teve cinco ovitrampas distribuídas conforme o desenho esquemático presente na Figura 9a, as quais foram numeradas e mantidas fixas na mesma posição para monitoramento da captura dos ovos por armadilha e por simulado, em cada semana e em tratamento. O simulado 1 continha sempre as ovitrampas numeradas de 1 a 5, no simulado 2 as ovitrampas com números entre 6 a 10 e no simulado 3 as de numeração 11 a 15. Para melhor visualização da coleta de ovos, as ovitrampas

foram agrupadas pela posição que ocupavam no interior dos simulados, independentemente do tratamento e semana. Com isso definiu-se:

Posição A: canto inferior esquerdo (ovitrampas 2, 9 e 11);

Posição B: canto inferior direito (ovitrampas 1, 6 e 12);

Posição C: área central (ovitrampas 3, 10 e 13);

Posição D: canto superior esquerdo (ovitrampas 4, 8 e 15) e;

Posição E: canto superior direito (ovitrampas 5, 7 e 14).

Para tornar os espaços de simulação mais próximos ao que seria um ambiente natural e, por se tratar de réplicas e evitar diferenças na coleta das amostras, a ambientação em cada uma das unidades do Simulado consistiu em fornecer abrigo e fontes de alimentação açucarada para as fêmeas soltas. Assim, utilizamos um conjunto de mesa e cadeira, um lírio e uma begônia, dispostos de modo equivalente (Figura 9b,c). As plantas eram regadas duas vezes por semana para se manter constantemente verdes e atrativas para que os mosquitos buscassem refúgio em suas folhas.

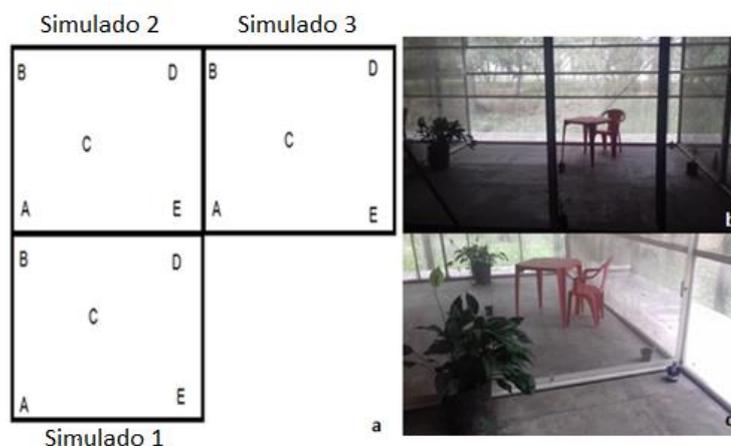


Figura 9: Representação esquemática das unidades do Simulado de campo (a); ambientação das unidades do Simulado (b,c).

## 4.2 Mosquitos – obtenção e criação em laboratório

Para a realização deste trabalho foi requerida uma população livre da *Wolbachia* e outra positiva para a bactéria. Mosquitos não infectados com a *Wolbachia* foram previamente coletados no bairro da Urca (22°56'56"43" S; 43°09'42"O), uma localidade altamente elitizada, com casas e edifícios amplos, elevada cobertura vegetal, oferta regular de água, saneamento e coleta de lixo,

porém é uma área de elevada infestação de mosquitos na cidade do Rio de Janeiro e alta frequência de *kdr* (David et al. 2009). A partir desses mosquitos uma colônia foi levantada e então a geração F2 foi utilizada. A wMelRio é uma linhagem de mosquitos de laboratório altamente resistentes a inseticidas, oriunda do cruzamento inicial de uma população de campo (Urca) e outra população de mosquitos infectados com a *Wolbachia* e background genético brasileiro, chamada wMelBr. Essa linhagem foi criada para liberação de mosquitos tão resistentes aos compostos químicos quanto às populações naturais de mosquitos brasileiros e assim viabilizar a invasão da bactéria em campo (Garcia et al. 2017). Neste estudo em particular utilizamos a geração F14 da população wMelRio.

Ovos das duas populações foram postos para eclosão, separadamente, em bacias plásticas contendo três litros de água desclorada e ração comercial para peixe (TetraMin®). Após a eclosão, para evitar competição por recursos que possam prejudicar o desenvolvimento dos mosquitos, 500 larvas de primeiro estágio de cada população foram transferidas para novas bacias e alimentadas com 0,45g de TetraMin® a cada dois dias (Figura 10a). As pupas resultantes eram realocadas em gaiolas cúbicas de 30 cm de lado, teladas em sua porção superior, onde emergiram os adultos. Ao todo, 200 *Ae. aegypti* adultos foram requeridos para composição de cada uma das colônias de laboratório. Machos e fêmeas foram mantidos juntos para ocorrência da cópula e inseminação das fêmeas.

Mosquitos adultos receberam 10% de solução açucarada *ad libitum* e as fêmeas foram alimentadas com sangue humano de bolsas provenientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/FIOCRUZ 53419815.9.0000.5248), usando um alimentador de membrana Hemotek (Hemotek Ltd), três dias antes das liberações no Simulado para cumprimento do ciclo gonotrófico (Dutra et al. 2015) (Figura 10b). Após a alimentação, 20 fêmeas visivelmente alimentadas de cada população foram separadas em potes e mantidas com solução açucarada até o momento da soltura nas unidades do Simulado, respeitando o tratamento a ser executado. Desta forma, foram liberadas no Simulado, apenas fêmeas prontas para realizar a postura de ovos nas horas seguintes.

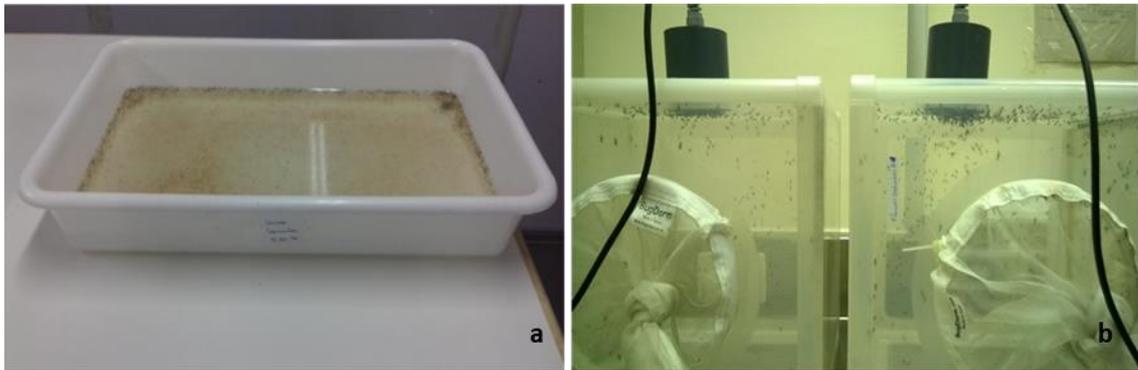


Figura 10: Processo de criação das larvas (a) e alimentação dos mosquitos em laboratório (b).

### 4.3 Tratamentos

Entre os meses de outubro e novembro de 2016, as unidades do Simulado de campo receberam 5 tratamentos contendo duas populações de *Ae. aegypti* de modo a simular diferentes frequências de *Wolbachia*. Assumiram-se as frequências de *Wolbachia* correspondentes a 10, 25, 50, 75 e 90% de mosquitos com a bactéria. Assim, fomos capazes de simular variações naturais da frequência de *Wolbachia* que ocorrem ao longo do processo de liberação de mosquitos com esta bactéria em campo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata (Figura 11). Buscou-se fazer as liberações sempre nos mesmos horários para diminuir o efeito de variáveis abióticas atuantes (Figura 12a).

		I	II	III
T R A T A M E N T O	10:90	02 fêmeas Wb* 18 fêmeas selv	02 fêmeas Wb* 18 fêmeas selv	02 fêmeas Wb* 18 fêmeas selv
	25:75	05 fêmeas Wb* 15 fêmeas selv	05 fêmeas Wb* 15 fêmeas selv	05 fêmeas Wb* 15 fêmeas selv
	50:50	10 fêmeas Wb* 10 fêmeas selv	10 fêmeas Wb* 10 fêmeas selv	10 fêmeas Wb* 10 fêmeas selv
	75:25	15 fêmeas Wb* 05 fêmeas selv	15 fêmeas Wb* 05 fêmeas selv	15 fêmeas Wb* 05 fêmeas selv
	90:10	18 fêmeas Wb* 02 fêmeas selv	18 fêmeas Wb* 02 fêmeas selv	18 fêmeas Wb* 02 fêmeas selv

Figura 11: Representação da densidade populacional de 20 mosquitos de *Aedes aegypti* e a quantidade de fêmeas infectadas e não infectadas com *Wolbachia* liberadas em cada tratamento e réplica.

Cada ovitrampa utilizada nos tratamentos recebeu 200ml de água e uma palheta para captura das amostras (ovos dos mosquitos liberados). Com o intuito de facilitar a contagem dos ovos e sua remoção para posterior análise da presença de *Wolbachia* via qPCR, as palhetas foram recobertas com um tecido branco e então fixadas nas ovitrampas com o auxílio de um clipe metálico (Figura 12b). Semanalmente, as palhetas e a água restante nas armadilhas eram recolhidas e então, os ovos contados e postos para eclosão no laboratório em temperatura constante de 28°C. As larvas já contidas nas ovitrampas recolhidas também foram coletadas (Figura 12c,d). Logo que atingiam o estágio L4, as lavas foram coletadas e separadas em tubos falcon contendo álcool 80% devidamente identificados, respeitando o tratamento, a unidade do Simulado, a ovitrampa e a semana em que foram coletadas. Algumas amostras chegaram ao estágio de pupa, mas seguiram o mesmo protocolo de armazenamento das larvas. A princípio, essa fonte de variação não deve ter produzido uma fonte de erro, tendo em vista que a reação de qPCR para a detecção de *Wolbachia* é a mesma se executada em larvas ou pupas (Dutra et al. 2015, Oliveira 2015). Os dados de temperatura foram obtidos através da estação meteorológica localizada na Vila Militar (A621), disponibilizado no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).



Figura 12: Liberação de fêmeas de *Aedes aegypti* no Simulado de Campo (a); Ovitrapas devidamente identificadas com palhetas recobertas e fixadas (b); Recolhimento das palhetas com os ovos e água com larva das ovitrampas (c,d).

#### 4.4 Detecção da *Wolbachia*

A partir do total de imaturos coletados, respeitando o nível de tolerância de 5%, um novo cálculo foi feito para reduzir a quantidade de material a ser processado e viabilizar o trabalho. Dos tubos armazenados foram recolhidas amostras que somadas equivaliam ao percentual exigido para cada armadilha e por fim para cada tratamento, de acordo com o nível de tolerância.

Para a extração do DNA (Figura 13), seguiu-se protocolo já descrito em publicações recentes (Dutra et al. 2015, Oliveira 2015). Cada larva foi lavada em água tipo I, secada em papel absorvente e colocada separadamente em um dos poços de placa Multiwell (96 poços). Uma solução contendo 5ml de squash buffer e 62,5µl de proteinase K foi preparada e, em cada poço da placa foi adicionado 50 µl desta solução juntamente com uma pérola de vidro estéril. Em seguida, a placa foi vedada com *strips* de plástico e colocada no agitador Beadbeater (Biospec Products) por um minuto e meio, para completa maceração. Cada placa foi centrifugada por 20s e encaminhada para um termociclador sofrendo ciclos de 56°C a 5min, 98°C a 15min e então resfriada a 14°C.

A detecção de *Wolbachia* baseou-se em uma amplificação Taqman qPCR de parte do gene WD0513 com os seguintes *primers* e sondas para detecção:

<i>prime</i> TM513_Forw	5'-CAAATTGCTCTTGTCTGTGG-3'
<i>prime</i> TM513_REV	5'-GGGTGTTAAGCAGAGTTACGG-3'
sonda TM513	5'-/cy5/TGAAATGGAAAATTGGCGAGGTGTAGG/3IAbRQSp/3'

Fragmentos do gene ribossomal RPS17 de *Ae. aegypti* também foram amplificados como forma de controle interno da presença do DNA do mosquito. Para esta amplificação e detecção foram utilizados os seguintes *primers* e sonda:

<i>prime</i> RPS17_Forw	5'-TCCGTGGTATCTCCATCAAGCT-3'
<i>prime</i> RPS17_REV	5'-CACTTCCGGCACGTAGTTGTC-3'
sondaRPS17	5'-/FAM/CAGGAGGAGGAACGTGAGCGCAG/BHQ_1/3'

Em todas as placas foram usados controles positivos: DNA de *Ae. aegypti* com e sem *Wolbachia*. Controles negativos também foram usados contendo DNA de *Ae. albopictus* ou apenas o *squash buffer*.

Os reagentes usados no qPCR foram: 5µl de TaqMan®, 0.5mM do *primer* RPS17, 0.6mM do *primer* TM513, 0.1mM da sonda RPS17, 0.25mM da sonda TM513 e 1µl do DNA diluído 10X em água para injeção. Água foi adicionada para completar o volume final de 10µl.

As análises eram feitas pela observação das amplificações das amostras com os valores de Ct em “Amplification Plot” e as curvas de fluorescência dos dois genes utilizados em “Multicomponent Plot”.



Figura 13: Extração e preparação da placa de PCR.

## 4.5 Modelagem

A partir dos dados obtidos, verificou-se efeitos de associação entre diversas variáveis, tais como: tratamento, número de ovos, frequência de *Wolbachia*, semana do tratamento, temperatura e outros. A quantidade mínima de amostra necessária para *screening*, considerando o menor erro amostral, foi estimada com base na aplicação de Regressão Quantílica - um conjunto de métodos estatísticos para estimar e extrair inferências sobre as funções de quantil condicionais; pode ser chamada de minimização de erros absolutos (Koenker 2005, dos Santos 2012). Todos esses testes foram realizados com o auxílio do software RStudio versão 1.0.153.

### 4.5.1 Efeito na fecundidade e fertilidade

A verificação da fecundidade e fertilidade em cada tratamento também foi realizada por meio de Modelo Linear Generalizado (MLG), onde o número de ovos

coletado foi analisado como dado de contagem (distribuição de Poisson) através das variáveis explicativas: local da ovitrampa, semana, tratamento e média das temperaturas máxima e mínima. Para as análises do percentual de eclosão observando o número de imaturos, realizou-se Regressão Logística através das mesmas variáveis explicativas utilizadas para o número de ovos.

#### **4.5.2 Cálculo para o número de imaturos testados**

A partir do total de imaturos coletados, um cálculo de número amostral foi feito para estimar o número mínimo necessário de amostras por réplica e por tratamento, assumindo um nível de tolerância de 5% e, posteriormente, estipulou-se a quantidade exigida para cada armadilha. Dos tubos armazenados foram recolhidas amostras que somadas equivaliam ao percentual exigido para cada armadilha e por fim para cada tratamento, de acordo com o nível de tolerância pré-determinado.

#### **4.5.3 Presença da *Wolbachia***

Com o intuito de observar os efeitos de associação na positividade da *Wolbachia* dentro dos tratamentos, foi realizada análise por MLG, onde a proporção de larvas positivas para a bactéria foi verificada através de Regressão Logística considerando-se as variáveis: local da armadilha, imaturos, ovos, semana e, tratamento.

#### **4.5.4 Cálculo do percentual amostral para screening com baixo erro amostral**

Foi realizada Regressão Quantílica para obter parâmetros de intervalo de confiança de 95% nos tratamentos a partir do número de larvas examinadas. Com os parâmetros obtidos foi possível simular e projetar os intervalos para quantidades maiores de larvas coletadas (situação presumível em campo). Do total dessas larvas, para cada tratamento, diferentes valores foram averiguados respeitando o aumento na proporção de 5% entre eles. Foi buscada a proporção em que a diferença entre as curvas dos quantis 97.5% e 2.5% equivalesse a um valor menor que 0.05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Tratamentos

Ao longo de cinco semanas, mosquitos *Aedes aegypti*, com variadas e conhecidas frequências de *Wolbachia*, foram liberados no Simulado de campo, representando diferentes pontos da invasão da bactéria numa população nativa do vetor. Todos os tratamentos foram aplicados com suas respectivas réplicas, porém, a cada semana somente três grupos de tratamentos eram realizados. Assim, nas três primeiras semanas foram testados os tratamentos 10:90, 25:75 e 50:50 (relação *Wolbachia*: selvagem). Na quarta semana, duas réplicas do tratamento 90:10 e uma réplica do tratamento 10:90 foram executadas e, na última semana, duas réplicas do tratamento 10:90 e uma réplica do tratamento 90:10 (Tabela 1). A escolha de qual frequência seria liberada em qual unidade obedeceu uma rotatividade dos tratamentos no Simulado, de modo que cada réplica de cada tratamento fosse aplicada em uma unidade diferente do Simulado de Campo e, portanto, sujeita a tais condições de microclima.

Cada unidade do simulado recebeu cinco ovitrampas, as quais foram numeradas e mantidas fixas na mesma posição e posteriormente agrupadas por posição dentro dos simulados. Em cada semana de experimento, o número de ovos coletados pelas ovitrampas e por simulado apresentou grande variabilidade entre os tratamentos testados (Figura 14). Entretanto, pode ser observado que alguns padrões se repetiram. Foi percebido, por exemplo, que em todas as semanas o simulado três foi o que coletou menor quantidade de ovos e que, em sua maioria (três das cinco semanas de ensaio: Semanas um, dois e cinco), o simulado 2 coletou ovos em maior quantidade.

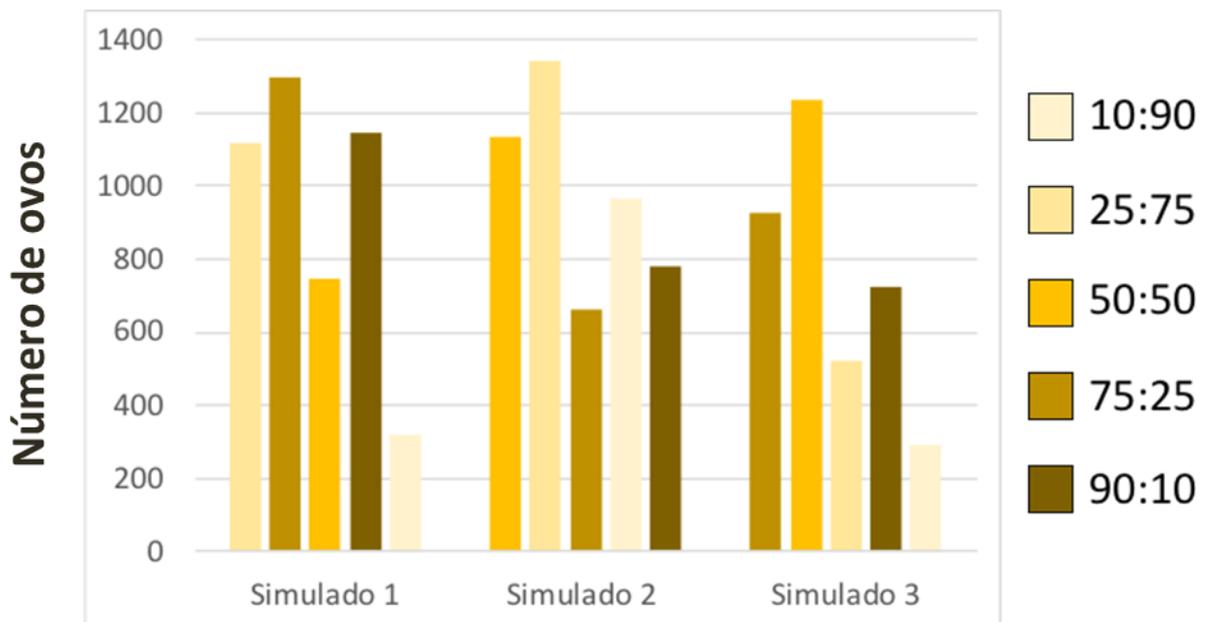


Figura 14: Gráfico do número de ovos por Simulado para cada semana dentro dos tratamentos .

Também constatou-se que, em praticamente todas as réplicas de todas as semanas, as armadilhas que assumiam posição central (posição C) dentro das unidades de soltura apresentaram um padrão de distribuição muito semelhante, com uma menor quantidade de ovos coletados (Figura 15).

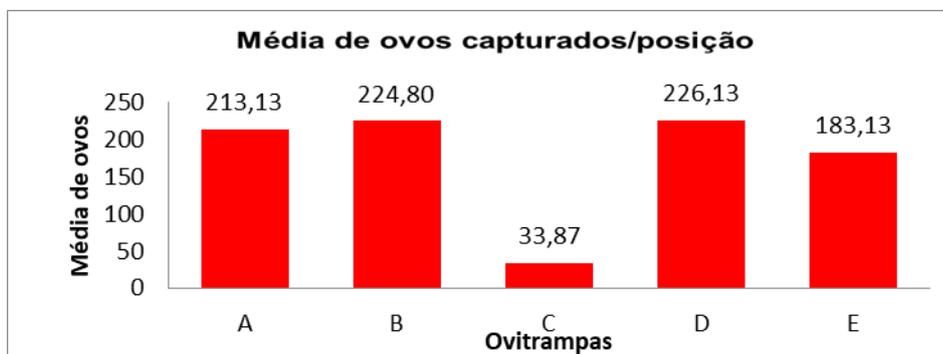


Figura 15: Média de ovos coletados pelas armadilhas considerando seu posicionamento no Simulado.

As exceções a esse padrão de coleta ocorreram em apenas duas ocasiões, no simulado 1 da semana 4 e no simulado 2 da semana 5. Nestes dois ensaios, a posição central da ovitrampa não pareceu influenciar negativamente no total de ovos coletados. Tais observações sugerem que condições do micro-habitat não exploradas nesse estudo podem afetar o comportamento de oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti*.

Considerando os tratamentos 25:75, 50:50 e 75:25, executados simultaneamente, a maior coleta de ovos em todos os casos foi vista na semana 2,

quando da aplicação da segunda réplica para os tais tratamentos. Por outro lado, a semana 3, que consistiu na terceira réplica para estes mesmos tratamentos, apresentou diminuição na coleta de ovos em todas as ocorrências. A réplica 1 do tratamento 10:90, aplicada na semana 4, coletou mais ovos que as outras duas réplicas aplicadas na semana 5. Para o tratamento 90:10, o número de ovos foi superior na réplica 1, executada na semana 4, seguida pela réplica 3, na semana 5 e a réplica 2, também na semana 4 (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição de ovos e imaturos coletados nos tratamentos, por semana e por réplica.

SEMANA 1											
TRATAMENTO 25:75 (Réplica 1)				TRATAMENTO 50:50 (Réplica 1)				TRATAMENTO 75:25 (Réplica 1)			
SIMULADO 1				SIMULADO 2				SIMULADO 3			
Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)
#1	300	277	92,3	#6	293	261	89,1	#11	219	200	91,3
#2	468	424	90,6	#7	199	185	93	#12	119	102	85,7
#3	54	45	83,3	#8	209	174	83,3	#13	1	0	0
#4	160	149	93,1	#9	427	374	87,6	#14	262	212	80,9
#5	135	126	93,3	#10	6	5	83,3	#15	325	290	89,2
Média	223,4	204,2			226,8	200			185,2	160,8	
Total	1117	1021	91,4		1134	999	88,1		926	804	87,0
SEMANA 2											
TRATAMENTO 25:75 (Réplica 2)				TRATAMENTO 50:50 (Réplica 2)				TRATAMENTO 75:25 (Réplica 2)			
SIMULADO 2				SIMULADO 3				SIMULADO 1			
Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)
#6	243	190	78,2	#11	179	135	75,4	#1	148	120	81
#7	420	276	65,7	#12	98	79	80,6	#2	426	329	77
#8	451	391	86,7	#13	3	2	66,7	#3	54	54	100
#9	227	186	81,9	#14	517	384	74,3	#4	520	334	64
#10	0	0		#15	441	328	74,4	#5	150	150	100
Média	268,2	209			248	186			260	197,4	
Total	1341	1043	79		1238	928	75,0		1298	987	76
SEMANA 3											
TRATAMENTO 25:75 (Réplica 3)				TRATAMENTO 50:50 (Réplica 3)				TRATAMENTO 75:25 (Réplica 3)			
SIMULADO 3				SIMULADO 1				SIMULADO 2			
Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)
#11	151	128	84,8	#1	136	62	45,6	#6	205	165	80,5
#12	102	81	79,4	#2	178	178	100	#7	199	159	79,9
#13	28	27	96,4	#3	7	6	85,7	#8	48	36	75
#14	148	142	95,9	#4	194	166	85,6	#9	209	170	81,3
#15	95	73	76,8	#5	231	228	98,7	#10	0	0	
Média	104,8	90,2			149,2	128			132,2	106	
Total	524	451	86,1		746	640	86		661	530	80,2

SEMANA 4											
TRATAMENTO 90:10 (Réplica 1)				TRATAMENTO 10:90 (Réplica 1)				TRATAMENTO 90:10 (Réplica 2)			
SIMULADO 1				SIMULADO 2				SIMULADO 3			
Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)
#1	6	6	100	#6	239	227	95	#11	43	21	48,8
#2	327	212	64,8	#7	370	257	69,5	#12	227	134	59
#3	293	229	78,2	#8	219	192	87,7	#13	0	0	
#4	328	327	99,7	#9	139	113	81,3	#14	257	186	72,4
#5	190	31	16,3	#10	0	0		#15	199	137	68,8
Média	228,8	161		193,4	157,8			145,2	95,6		
Total	1144	805	70,4	967	789	82		726	478	66	
SEMANA 5											
TRATAMENTO 10:90 (Réplica 2)				TRATAMENTO 90:10 (Réplica 3)				TRATAMENTO 10:90 (Réplica 3)			
SIMULADO 1				SIMULADO 2				SIMULADO 3			
Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)	Ovitampa	Ovo	Imaturo	% (I/O)
#1	175	81	46,3	#6	355	211	59,4	#11	68	68	100
#2	44	40	90,9	#7	260	219	84,2	#12	101	50	49,5
#3	6	6	100	#8	32	21	65,6	#13	14	14	100
#4	63	44	69,8	#9	92	63	68,5	#14	23	12	52,2
#5	31	28	90,3	#10	42	20	47,6	#15	88	73	83
Média	63,8	39,8		156,2	106,8			58,8	43,4		
Total	319	199	62,4	781	534	68,4		294	217	74	

Observando-se o somatório das réplicas, o maior número de ovos foi coletado no tratamento 50:50, seguido pelos tratamentos 25:75, 75:25, 90:10 e 10:90 (Tabela 2). Ou seja, menor número de ovos foi coletado quando a frequência de *Wolbachia* apresentava-se em seus extremos, ou 10 ou 90% dos insetos liberados com *Wolbachia* em cada unidade do Simulado.

Ao final dos ensaios de soltura de populações de *Aedes aegypti* com diferentes frequências de mosquitos com *Wolbachia* no Simulado de campo, foram coletados 13.216 ovos das ovitrampas instaladas, dos quais uma média global de 79% eclodiu quando colocado em água.

Tabela 2: Quadro geral da captura de ovos, percentual de eclosão e total de imaturos obtidos em cada tratamentos.

Tratamento	Total de ovos coletados	Total de imaturos coletados	% de eclosão
10:90	1580	1205	76,3%
25:75	2982	2515	84,3%
50:50	3118	2567	82,3%
75:25	2885	2321	80,5%
90:10	2651	1817	68,5%
<b>Total</b>	<b>13216</b>	<b>10425</b>	<b>79%</b>

Considerando a relação imaturos/ovos, todos os tratamentos registraram perda no percentual de eclosão, o que é esperado (Figura 16). Na maioria dos tratamentos (10:90, 25:75, 50:50 e 75:25) as taxas de eclosão foram superiores a 75%, sendo que nas frequências intermediárias ultrapassaram 80%. Entretanto, no tratamento 90:10 a taxa de eclosão foi de apenas 68,5%, representando um insucesso superior a 30%. É possível que essa notável queda de eclosão dos ovos no tratamento (90:10) seja um indicador do custo na viabilidade dos ovos pela presença da bactéria no mosquito.

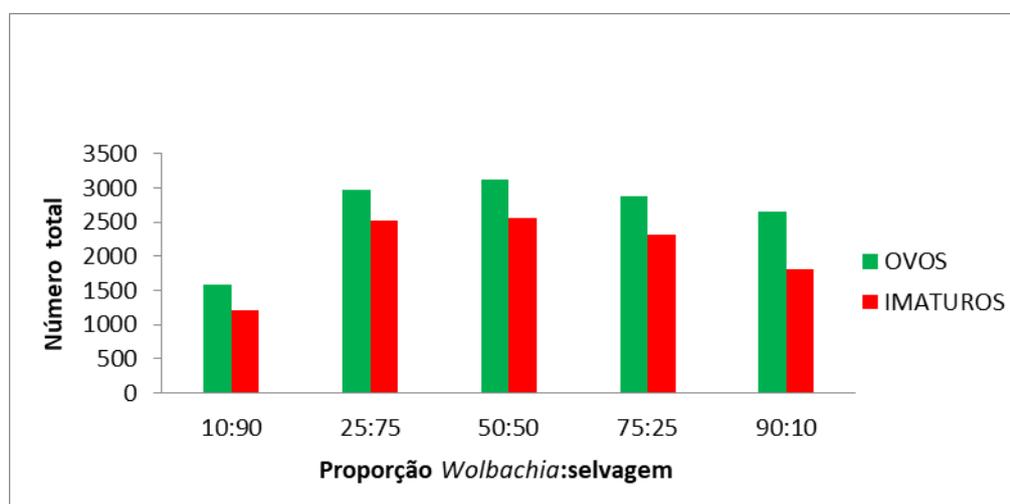


Figura 16: Gráfico da fecundidade e viabilidade dos ovos nos tratamentos experimentados.

A estação meteorológica da Vila Militar-A621 serviu como fonte dos dados de temperatura pela maior proximidade com a área de execução dos experimentos. O banco de dados disponível gratuitamente no site do Inmet forneceu as temperaturas instantânea, mínima e máxima a cada hora dos dias. Para este trabalho, apenas os valores de temperatura mínima e máxima foram consideradas e por isso calculou-se as médias das máximas e das mínimas de cada dia por semana. As menores temperaturas máximas foram observadas nas semanas um e cinco (Tabela 3). Estatisticamente, tanto as temperaturas mais elevadas quanto o tipo de tratamento aplicado demonstraram associação positiva com a quantidade de ovos coletados ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, houve decréscimo no número de ovos com local C, semana e temperatura mínima ( $p < 0.001$ ). As análises estatísticas indicaram associação negativa entre o número de imaturos e o tratamento ( $p < 0.001$ ) e semana ( $p < 0.001$ ).

Tabela 3: Médias de temperatura máxima e mínima a cada semana.

	Média/T° Máxima	Média/ T° Mínima
<b>Semana 1</b>	27,4°C	18,5°C
<b>Semana 2</b>	32,9°C	23,2°C
<b>Semana 3</b>	29,1°C	22,9°C
<b>Semana 4</b>	31,9°C	19,3°C
<b>Semana 5</b>	27,9°C	20,5°C

## 5.2 Frequência da *Wolbachia*

Os imaturos coletados em cada ovitrampa foram acondicionados em grupos de até cinquenta larvas/pupas e então preservados em tubos Falcon devidamente identificados. De cada tubo foram retiradas aleatoriamente amostras para serem analisadas via qPCR com base no cálculo para a quantidade mínima de amostras testadas por tratamento. A quantidade de material processado por tubo, por armadilha, bem como a soma das armadilhas por tratamento foi considerada para composição dos gráficos. Neste trabalho, um total de 2842 (correspondente a 27,3% do total de 10425 imaturos coletados) larvas coletadas foram testadas para a presença de *Wolbachia*, sendo que para cada tratamento a quantidade absoluta e o percentual foi o seguinte: Tratamento 10:90 (303; 25,1%); Tratamento 25:75 (670;

27%), Tratamento 50:50 (849; 33%), Tratamento 75:25 (664; 29%) e Tratamento 90:10 (356; 19,6%).

Se assumirmos que a fecundidade de fêmeas com e sem *Wolbachia* tende a ser semelhante, deveríamos encontrar nas larvas a mesma frequência de infectados observada nos adultos liberados. Ou seja, no tratamento 25:75, cerca de 25% das larvas deveriam ser infectadas, enquanto que os aproximadamente 75% restantes deveriam estar livres da bactéria. Como esperado, os números observados demonstraram grande proximidade com os tratamentos testados (Figura 17).

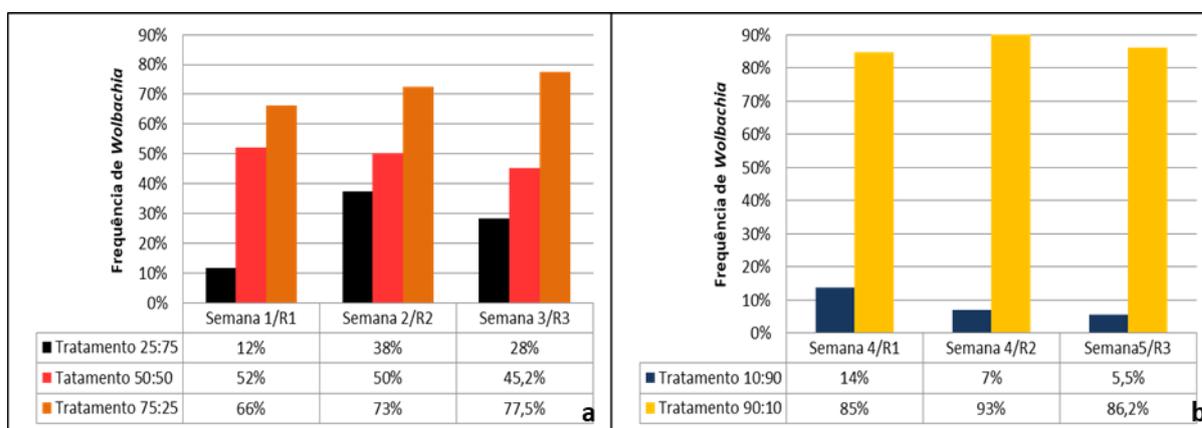


Figura 17: Distribuição semanal da frequência de *Wolbachia* por tratamento testado e réplica após as análises via qPCR.

Quando considerados apenas os valores por armadilha, percebe-se uma maior variação na frequência de *Wolbachia* dentro dos tratamentos, comparados à soma dessas armadilhas. De qualquer modo, como esperado, observou-se que as frequências obtidas foram correspondentes ou muito próximas às frequências testadas: Tratamento 10:90 (F=9,2%); Tratamento 25:75 (F=25,5%); Tratamento 50:50 (F=49,3%); Tratamento 75:25 (F=72%) e Tratamento 90:10 (F=88%). (Figura 18).

Através do modelo de regressão logística encontrou-se uma relação positiva entre a presença de *Wolbachia* e o tratamento testado ( $p < 0.001$ ). Não foram observados efeitos de associação significantes entre o número de imaturos, número de ovos e temperatura com a positividade da bactéria ( $p > 0.05$ ).

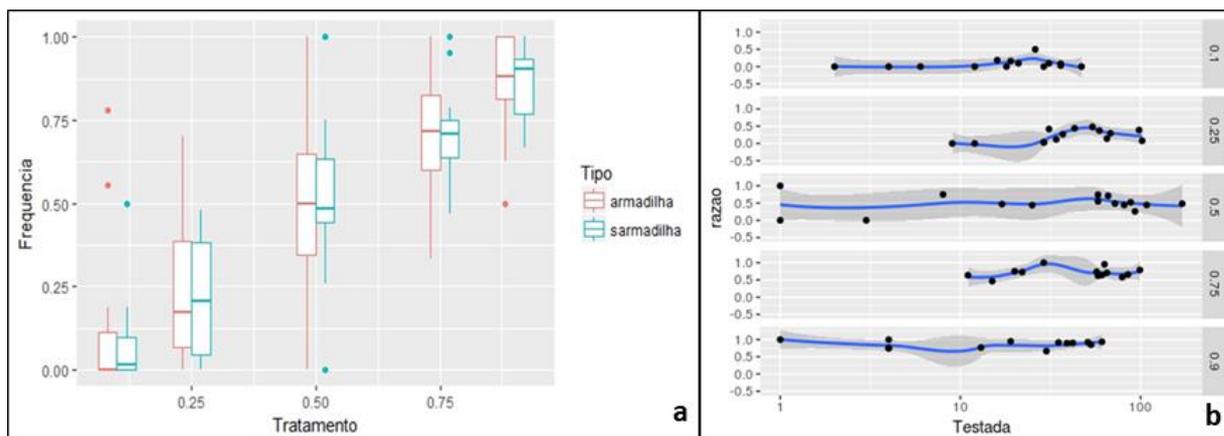


Figura 18: Boxplot da distribuição da frequência de *Wolbachia* observada pelas ovitrampas. (a) Distribuição nos tratamentos (armadilha = amostras coletadas por tubo de cada ovitrampa; s-armadilha = soma das amostras das ovitrampas por tratamento). (b) Frequência observada por número de amostras testadas em cada tratamento (curvas geradas por função de suavização; as áreas sombreadas representam o intervalo de confiança).

### 5.3 Percentual amostral para *screening* com baixo erro amostral

Para os tratamentos experimentados, considerou-se: o tratamento em questão, o número de larvas verificadas e a positividade da *Wolbachia* em cada tratamento para a modelagem e estimativa do menor percentual de amostras que devem ser apuradas pelas ovitrampas através de *screening* e que representem um baixo erro na estimativa da frequência da *Wolbachia* em populações de *Aedes aegypti* em campo. Diferentes porcentagens do número total de imaturos testados em cada tratamento foram utilizadas na Regressão Quantílica e o *ggplot* foi requerido na plotagem dos gráficos (faixa de quantis = 97.5% e 2.5%) para estimativa do erro amostral. Na figura 19, somou-se as amostras coletadas pelas ovitrampas em cada tratamento estudado com o intuito de dar mais robustez aos dados e reduzir o erro amostral quando comparados às amostras observadas das armadilhas por tubos.

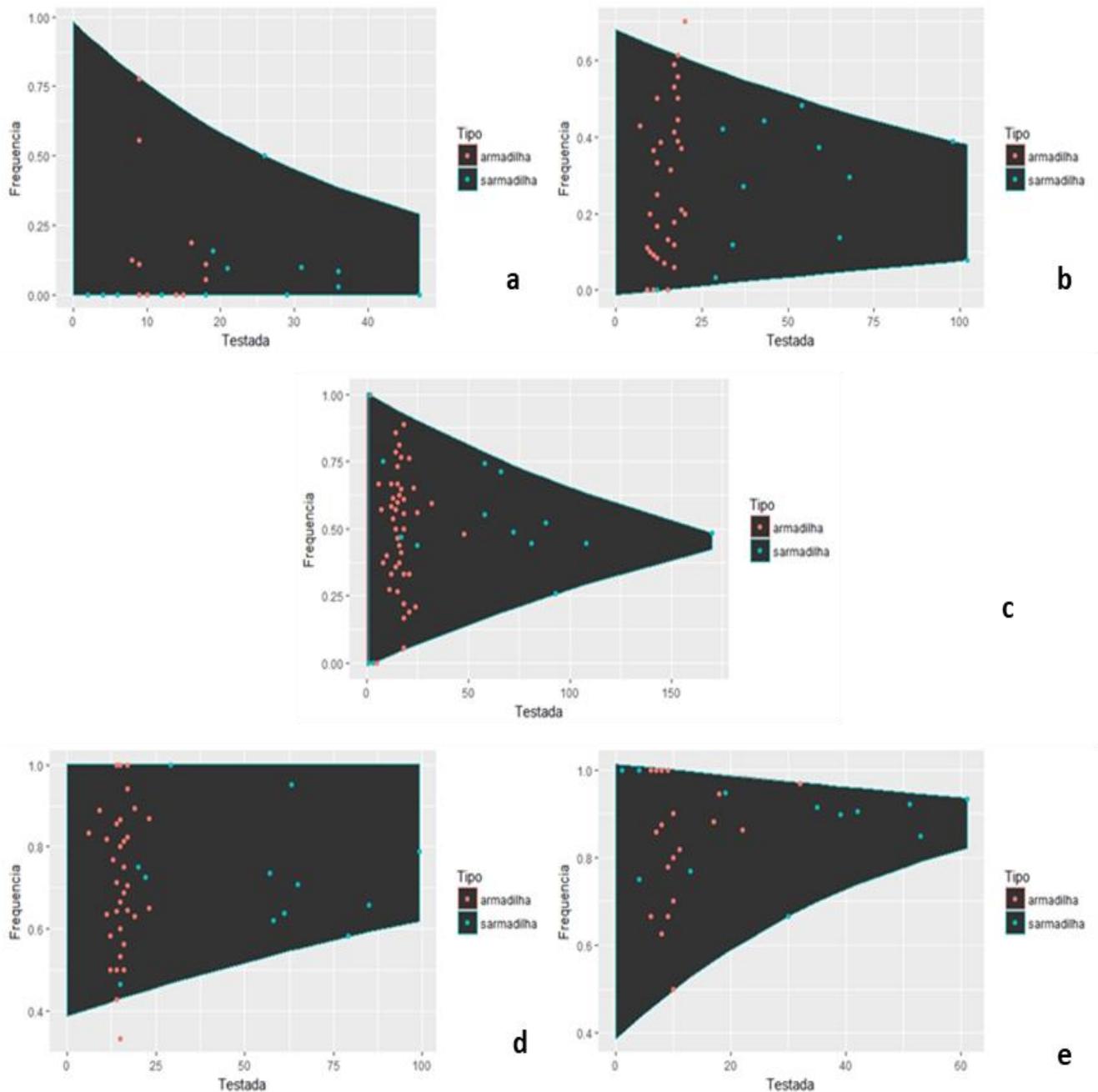


Figura 19: Relação entre frequência de *Wolbachia* encontrada, amostras testadas e variação do intervalo amostral gerada pela regressão quantílica: (a) Tratamento 10:90; (b) Tratamento 25:75; (c) Tratamento 50:50; (d) Tratamento 75:25; (e) Tratamento 90:10. Armadilha = amostras coletadas por tubo de cada ovitrampa; s-armadilha = soma das amostras das ovitrampas por tratamento. A área escura corresponde ao intervalo de probabilidade de existência da frequência.

Cada tratamento experimentado representa um momento específico de uma curva de invasão da *Wolbachia* em campo em populações naturais de mosquitos *Aedes aegypti*. O objetivo principal destas simulações era observar como as

ovitrampas responderiam a essas diferentes situações empíricas para estimar a frequência de *Wolbachia* em campo.

A partir dos resultados obtidos, percebeu-se que para estimar com confiabilidade a invasão da *Wolbachia* por meio das ovitrampas, os tratamentos reivindicaram diferentes percentuais de coleta necessários para o *screening* (Figura 20). O tratamento 50:50 exigiu menor porcentagem de coleta de amostra (em torno de 20%;  $E = 0.05$ ) seguido dos tratamentos 90:10 (em torno de 22%;  $E < 0.05$ ), 25:75 (33%;  $E < 0.05$ ) e 10:90 (40%;  $E < 0.05$ ). O tratamento 75:25 foi o que requereu maior quantidade de amostra com um baixo erro amostral (80%;  $E < 0.05$ ) (Tabela 4).

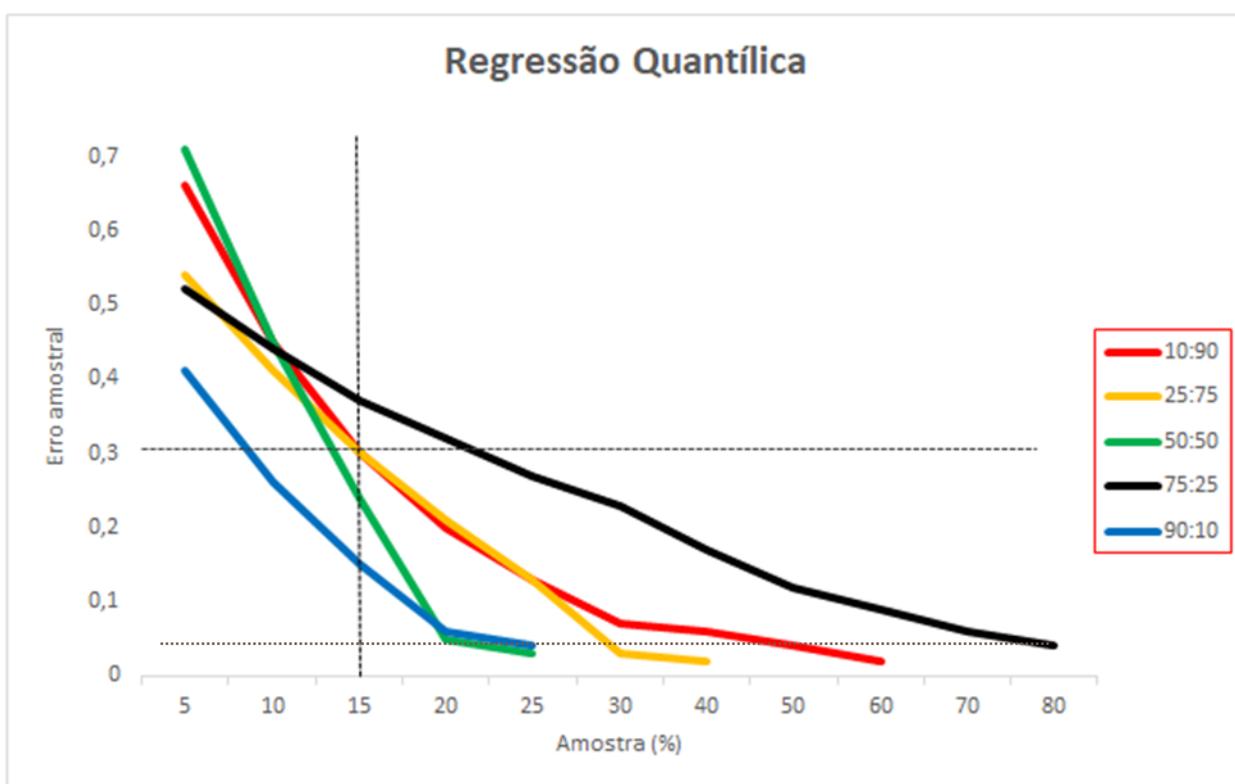


Figura 20: Percentual amostral requerido para *screening* nos tratamentos e o erro amostral. A linha pontilhada vertical representa o percentual, em média, de larvas amostradas durante a liberação de mosquitos com *Wolbachia* em Tubiacanga. A linha pontilhada horizontal marrom equivale ao erro de 5% nas estimativas obtido pela regressão quantílica, enquanto a linha horizontal pontilhada preta representa um erro amostral de 30% em nossas estimativas, percentual máximo arbitrariamente aceito pela equipe.

Tabela 4: Erro amostral da frequência de *Wolbachia* para diferentes proporções de material analisado nos tratamentos.

Tratamento	Amostra testada	%	Erro amostral (E)
0.1	15	5	0.66
0.1	30	10	0.45
0.1	45	15	0.30
0.1	61	20	0.20
0.1	76	25	0.13
0.1	100	30	0.07
0.1	106	35	0.06
0.1	121	40	0.04
0.1	136	45	0.02
0.25	34	5	0.54
0.25	67	10	0.41
0.25	100	15	0.30
0.25	134	20	0.21
0.25	168	25	0.13
0.25	201	30	0.06
0.25	221	33	0.02
0.5	43	5	0.71
0.5	85	10	0.45
0.5	127	15	0.24
0.5	170	20	0.05
0.5	175	20.6	0.03
0.75	33	5	0.52
0.75	66	10	0.44
0.75	100	15	0.37
0.75	133	20	0.32
0.75	166	25	0.27
0.75	199	30	0.23
0.75	266	40	0.17
0.75	332	50	0.12
0.75	398	60	0.09
0.75	465	70	0.06
0.75	531	80	0.04
0.9	18	5	0.41
0.9	36	10	0.26
0.9	53	15	0.15
0.9	71	20	0.06
0.9	78	22	0.04

#### 5.4 Revisitando o dado de campo

Com a expansão do projeto para novas áreas, e um aumento do território a ser monitorado, não é mais viável analisar toda a amostra capturada pelas BGs. Em contrapartida, a estimativa gerada pelas ovitrampas em campo considerou uma amostragem de aproximadamente 15% das larvas coletadas.

Quando comparadas as curvas de invasão da *Wolbachia* geradas pelas BGs e ovitrampas durante as liberações em Tubiacanga, percebe-se que na primeira semana, a frequência da bactéria é estimada em torno de 20% pela BG, enquanto que pela ovitampa, a taxa de invasão foi de cerca de 10% (Figura 7). No Simulado, no tratamento de 10% frequência de *Wolbachia* (10:90), observou-se um erro amostral de 30% quando se analisa individualmente cerca de 15% das larvas coletadas. A extrapolação desse erro amostral para os dados das ovitrampas de campo indicaria um percentual de invasão entre 7-13%. Assim, no início da liberação de *Wolbachia* numa área, quando a frequência da bactéria ainda seria baixa, as ovitrampas seriam incapazes de prever com precisão com a coleta de apenas 15% do material. Por outro lado, nas demais frequências (à exceção de 75:25), analisar individualmente 15% de todas as larvas coletadas parece fornecer índices de invasão bastante sólidos e condizentes com o observado através das BG-Sentinela. Se ainda aumentarmos ligeiramente o percentual de amostras analisadas para 20%, o erro amostral ainda é reduzido consideravelmente.

Cabe ressaltar que após o término das liberações, quando espera-se invasão completa e frequência de *Wolbachia* acima de 90-95%, o percentual de larvas analisadas poderia ser em torno de 7% mantendo-se o erro amostral em torno de 30%. Se, por acaso, for de interesse da Secretaria Municipal de Saúde responsável pela área de estudo, ter um monitoramento mais refinado da manutenção da frequência da *Wolbachia* em campo, pode-se realizar o *screening* individual em 15% das larvas coletadas e assim ter um erro associado de aproximadamente 15% em suas estimativas.

Analisando apenas os dados de erro amostral, o tratamento 75:25 foi o que apresentou maior valor de erro (37%) em comparação com o tratamento 90:10 (15%). Especulando-se que as taxas de invasão se manterão correspondentes para BGs e ovitrampas a partir desse momento, não parece viável a utilização das ovitrampas quando da invasão a 75% em campo. Em contrapartida, pode-se considerar que na frequência de 90%, as ovitrampas serão altamente eficientes para estimação da *Wolbachia* em campo.

## 6 DISCUSSÃO

Dados de campo oriundos da coleta de amostras de populações de mosquitos *Aedes aegypti* são importantes para fornecer informações sobre a ecologia do vetor, gerando maior conhecimento acerca de seus hábitos no ambiente natural. De fato, estimativas robustas e confiáveis a respeito da capacidade vetorial do *Ae. aegypti* podem ser traduzidas em um melhor entendimento sobre a epidemiologia e transmissão de arbovírus, bem como otimizar atividades de vigilância que podem, por sua vez, intensificar o controle vetorial. Para isso, é necessário um método de coleta eficiente que gere uma estimativa rápida, realista e padronizada de parâmetros pertinentes. Dentre tais ferramentas, destacam-se armadilhas de mosquito, cujo desenvolvimento tem sido impulsionado nas duas últimas décadas pelo papel do *Ae. aegypti* na transmissão de diferentes agentes etiológicos (Maciel-de-Freitas et al. 2006). Atualmente, inúmeras armadilhas estão disponíveis para coleta de *Ae. aegypti*, e estas apresentam atuação variada em sua atratividade, especificidade para a coleta da espécie-alvo nos diferentes estágios de vida do mosquito, facilidade de uso e custo para implementação e manutenção (Codeço et al. 2015). Portanto, a depender dos objetivos de cada estudo, o uso de determinada armadilha pode ser mais indicado que outras. Da mesma forma, armadilhas muito utilizadas podem não ser recomendadas em situações específicas. Por exemplo, se o objetivo de um estudo é coletar indivíduos adultos marcados com pó fluorescente e liberados em campo durante um estudo de marcação, soltura e recaptura, o uso da ovitrampa não seria recomendado.

A utilização da bactéria *Wolbachia*, que é vista como promissora, já está sendo aplicada em diversos países como Austrália, Vietnã, Indonésia, Sri Lanka, Quiribati, Índia, Fiji, Vanuatu, Brasil, Colômbia, Nova Caledônia e México. Além de ser empregada para substituição da população de mosquitos livres da bactéria por aquela infectada com a *Wolbachia* visando a redução da transmissão das arboviroses pelo bloqueio ou restringimento da replicação viral, essa estratégia pode ainda ser utilizada como via de supressão dos mosquitos quando da liberação exclusiva de machos portadores da *Wolbachia* que, ao cruzarem com fêmeas de campo, não são capazes de produzir uma progênie viável tendo como resultado a não eclosão dos ovos em decorrência da incompatibilidade citoplasmática (Laven 1957, Yen e Barr 1971).

Apesar de apresentar algumas particularidades entre os países envolvidos, existem atividades neste processo que mudam pouco entre as áreas. Nas localidades em que a população selvagem de mosquitos *Aedes aegypti* vem sendo substituída por aquela contendo a bactéria *Wolbachia*, o monitoramento tanto das populações dos mosquitos quanto da frequência da bactéria em campo torna-se imprescindível não apenas para estimar o sucesso de utilização dessa metodologia, mas também para ajustar o número de mosquitos a serem liberados a fim de ultrapassar o limiar considerado necessário para a invasão da *Wolbachia* (Turelli 2010, Hoffmann et al. 2011, Ritchie et al. 2013). Ao longo das liberações de mosquitos com *Wolbachia*, o monitoramento dessas populações de mosquitos é predominantemente realizado através das armadilhas BG-Sentinel. Entretanto, a análise de custo-benefício desta armadilha tem encorajado o monitoramento da frequência de *Wolbachia* por outras armadilhas, como é o caso das ovitrampas.

Se por um lado as BGS são reconhecidas como armadilhas bastante eficientes para captura de mosquitos *Ae. aegypti* adultos (Maciel-de Freitas 2006, Degener et al. 2014, Codeço et al. 2015), em outra mão, as ovitrampas já são largamente utilizadas na vigilância de populações de mosquitos e podem fornecer alto nível de resposta espacial da densidade de mosquitos (Mackay et al. 2013, Hoffmann et al. 2014). Um estudo feito por Codeço e colaboradores (2015) avaliou diversas armadilhas para coleta de *Aedes aegypti* em campo, entre elas a BGS e a ovitrampa. Os resultados desse estudo demonstraram que as ovitrampas apresentam especificidade acima de 90%, enquanto a BGS é a menos específica. Também foi demonstrado que os custos diretos com implementação e manutenção foram maiores para a BGS em relação às ovitrampas. Em contrapartida, custos com equipe de campo foram muito mais significativos para as ovitrampas. O custo de uma BG-Sentinela para monitorar populações de *Ae. aegypti* por 12 meses é cerca de 240 vezes superior ao de uma ovitrampa, tendo em vista que a BGS é importada, sujeita a oscilações cambiais do mercado internacional ou de procedimentos de importação e, ainda, depende da cooperação dos proprietários das casas e de localidades seguras para sua instalação na rede elétrica da residência escolhida.

Na prática, a ovitrampa já vem sendo utilizada como instrumento de monitoramento em algumas das localidades de soltura de populações de mosquitos com *Wolbachia*, entretanto, sua utilização é considerada em todos os casos como secundária, apenas para servir de apoio ou complemento aos dados fornecidos pelas BGS. Para Hoffmann et al. (2011), a amostragem de estágios imaturos com

ovitrampas representa uma abordagem simples, que pode dar um alto nível de variação espacial em um ponto de soltura.

Em linhas gerais, o cerne desta dissertação foi avaliar a ovitrampa como uma ferramenta eficiente, confiável e economicamente viável para estimar a invasão da bactéria *Wolbachia* em campo. Até a conclusão deste trabalho, nenhum experimento de liberações de mosquitos com *Wolbachia* havia sido realizado em condições de semi-campo. A partir dos nossos experimentos, pudemos verificar a viabilidade de ensaios com populações de *Aedes aegypti* com *Wolbachia* nessas condições e demonstrar a atração das fêmeas grávidas e captura de seus ovos pelas ovitrampas.

Neste trabalho, a menor quantidade de ovos obtidos no tratamento com menor frequência de *Wolbachia* (Tratamento 10:90) é uma observação interessante, uma vez que nossos resultados diferem de estudos que indicam menor postura de ovos por fêmeas de *Aedes aegypti* com *Wolbachia* comparadas a fêmeas selvagens (Hoffmann et al. 2014, Garcia et al. 2017). A fecundidade é um importante parâmetro biológico para o vetor e também para a *Wolbachia*. Quanto maior for a fecundidade, mais rápida será a disseminação da bactéria (Rasgon e Scott 2003). Dutra e colaboradores (2015) ao avaliar a fecundidade dos mosquitos brasileiros infectados com *Wolbachia* não observou diferenças significativas nos níveis de fecundidade devido à presença da infecção por wMel, assim como visto nos mosquitos com background genético australiano.

Quanto à produção de imaturos, apesar de percebermos perda no percentual de eclosão em todos os tratamentos testados, a redução mais marcante foi vista no Tratamento 90:10, aquele cuja frequência de mosquitos infectados com a bactéria é maior. A baixa produção de larvas pelas fêmeas infectadas em comparação com fêmeas não infectadas também foi vista em duas localidades de Queensland, Austrália, e foi significativamente associada à infecção pela bactéria (Hoffmann et al. 2014). Dutra et al. (2015), ainda investigando sobre a incompatibilidade citoplasmática causada pela cepa wMel, também observou que a viabilidade dos ovos foi maior quando houve cruzamento entre machos e fêmeas não infectados do que quando do cruzamento de machos não infectados com fêmeas infectadas com *Wolbachia*, sugerindo que pode haver um pequeno custo no fitness associado à infecção que leva a redução da viabilidade do ovo.

De um modo geral, os resultados obtidos nas frequências extremas apresentaram-se de difícil interpretação. Um reduzido número de ovos foi coletado quando a densidade da *Wolbachia* esteve baixa (10:90), sugerindo que fêmeas com

a bactéria apresentam fecundidade mais alta que as fêmeas livres de *Wolbachia*. Tal característica seria positiva e favoreceria a invasão em populações nativas de *Ae. aegypti*. Por outro lado, a baixa taxa de eclosão no tratamento 90:10 sugere que os ovos com *Wolbachia* podem ter maior sensibilidade a variações microclimáticas que os ovos das fêmeas não infectadas. Essa característica seria negativa e, numa situação de campo, deve retardar ou até mesmo, dependendo de sua intensidade, inviabilizar a invasão de populações nativas de *Ae. aegypti*.

Serpa et al. (2007) ao investigar a variação sazonal de *Ae. aegypti* encontrou relação significativa entre a temperatura máxima e a ocorrência de formas imaturas, semelhantemente aos resultados aqui encontrados. Entretanto, Bonat et al. (2009) estudando fatores associados a contagens de ovos de *Aedes aegypti* coletados em ovitrampas em Recife observou que o aumento da temperatura (máxima ou mínima) tendia para a diminuição do número de ovos coletados, diferentemente da influência de umidade e precipitação que aumentavam a quantidade de ovos.

Alguns fatores como umidade relativa do ar e precipitação, que poderiam contribuir para melhor análise dos resultados não foram considerados neste trabalho. Nos estudos de Bonat e colaboradores (2009), os resultados demonstraram que esses fatores climáticos foram extremamente importantes para a reprodução do mosquito. Devido à grande variabilidade nas condições ambientais ao longo das semanas de experimento, a correlação do número de ovos e número de imaturos apenas com a temperatura máxima e semana nos gerou dados insuficientes e trouxe incertezas quanto aos reais fatores que poderiam estar influenciando nossos resultados. A análise da associação com fatores climáticos é algo de difícil execução, tendo em vista que não se sabe ao certo quais seriam as condições climáticas que apresentam maior associação com tais dados (Bonat et al. 2009).

Apesar das armadilhas estarem sob as mesmas condições ambientais, a posição em que as mesmas se encontravam suscitou interpelações sobre interferências do posicionamento da armadilha na captura das amostras e análise de dados. A falta de uma estrutura de escoramento para os mosquitos no entorno das ovitrampas de posição central, por exemplo, pode ter sido um dos motivos da pouca coleta de ovos por essas armadilhas. Reações visuais, olfativas e táteis estão envolvidas na localização e seleção de criadouros pelas fêmeas de culicídeos (Bentley e Day 1989). Por não apresentarem comportamento de cuidado parental, selecionar um bom local para oviposição aumenta a chance de sobrevivência dos

descendentes, garantem a emergência de maior número de adultos e diminui os efeitos de predação (Eiras 2001). Com isso, acreditamos que a menor quantidade de ovos nas ovitrampas centrais, cenário observado em 13 das 15 liberações (86,7%), seja resultado tão somente da falta de abrigos e paredes para o repouso das fêmeas liberadas no Simulado.

Por meio das simulações de soltura de populações de mosquitos com frequências de *Wolbachia* previamente estabelecidas, as ovitrampas se mostraram capazes de refletir com precisão a frequência de mosquitos com a bactéria liberados no Simulado. Vale ressaltar que, apesar das limitações de recursos financeiros que permitiram a análise de apenas 27,3% das larvas coletas, a precisão na estimativa da frequência da *Wolbachia* indica que o percentual de larvas processadas foi o suficiente. Este fato confere à ovitrampa um elevado grau de confiabilidade para sua utilização como ferramenta de monitoramento. Segundo Yeap e colaboradores (2013), as ovitrampas são bastante vantajosas durante as liberações de mosquitos com *Wolbachia* por fornecerem estimativas precisas da frequência da *Wolbachia* por atrair fêmeas infectadas prontas para oviposição e estas conseqüentemente, acabam contribuindo para a população natural. Se considerarmos que a transmissão da *Wolbachia* é vertical, através da mãe infectada para a prole, o uso desta armadilha pode estimar o número de larvas com *Wolbachia* que chegaria ao ambiente a cada geração (recrutamento). Tantowijoyo et al. (2015) investigando a variação espacial e temporal de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* com implicações para liberação de mosquitos com *Wolbachia*, observaram que as capturas em BGs e ovitrampas apresentaram o mesmo padrão espacial na coleta em 5 aldeias ao redor da cidade de Yogyakarta, Indonésia. Além disso, viram que a ovitrampa pode propiciar monitoramento efetivo mesmo quando designado apenas para presença ou ausência de mosquitos. De certo modo, esse estudo sinaliza a importância das condições climáticas do local, o comportamento humano, a extensão da urbanização e as interações das espécies na resposta refletida pelas armadilhas (Tantowijoyo et al. 2015).

Nos resultados de campo, 15% das larvas coletadas pelas ovitrampas passaram por análise individual. A partir dessa informação, quando comparadas as taxas de invasão de campo com as taxas obtidas neste trabalho observando-se o percentual de 15% das amostras testadas e buscando-se baixo erro amostral na estimativa da frequência da *Wolbachia*, percebeu-se que a resposta das ovitrampas variou entre os tratamentos. De acordo com o nosso modelo, para o tratamento

10:90, 15% das amostras testadas geraram um erro amostral de 30%, o que levou a uma grande variação na estimativa do percentual de invasão quando extrapolado para os dados de campo. Ainda assim, o percentual estimado pelas ovitrampas testadas nesse tratamento não conseguiram alcançar o percentual gerado pelas BGs em campo. Nos tratamentos 25:75, 50:50, 15% das larvas analisadas foram suficientes para gerar estimativas condizentes com as observadas em cada uma dessas condições de *Wolbachia*/selvagem em campo. Esses resultados indicam que nessas condições de campo, a ovitrampa pode ser altamente eficiente e viável economicamente para estimar a invasão da *Wolbachia* em campo. Apesar de não ter sido possível avaliar a invasão da bactéria em campo para frequências superiores a 65%, é plausível considerar que no tratamento 75:25, o percentual de amostras requerido das ovitrampas deva ser superior ao desejado de 15% considerando que o erro amostral estabeleceu-se acima de 30%, como visto para o tratamento 10:90. Para estas condições específicas a ovitrampa é inviável economicamente para utilização em larga escala. Mais estudos precisam ser desenvolvidos para entender o porquê do resultado encontrado para o tratamento 75:25. Nos casos em que a invasão encontra-se em seu estado final, com frequência de 90%, esse percentual de erro amostral caiu para 15%. Deve-se considerar que no caso das BGS, todo material coletado precisa passar pelo *screening* para estimar a invasão da *Wolbachia* e em termos de quantidade de amostra coletada, as ovitrampas podem capturar maior quantidade de material. Assim, parece ser muito mais interessante economicamente que, após o fim das liberações e invasão completa da *Wolbachia*, o monitoramento da frequência da bactéria possa ser feito com a análise individual de cerca de 7% do material coletado.

A detecção da *Wolbachia* tem como base o método de PCR (Reação em cadeia polimerase), bem como no PCR-RT (Real Time qPCR). Este último permite a detecção ciclo a ciclo, com elevada sensibilidade e especificidade, possibilitando uma análise qualitativa e quantitativa da presença da bactéria. O alvo principal dessas técnicas para a identificação da *Wolbachia* é o gene WSP que codifica a proteína de superfície da bactéria, além do gene ribossomal 16S rRNA (Moreira et al. 2009, Simoes et al. 2011). Os custos de execução dessas técnicas são onerosos e demandam sofisticada maquinaria. Em um levantamento feito por Gonçalves (2014), o custo em Reais (R\$) por reação em um PCR convencional foi de R\$6,39 e o preço dos equipamentos somados atingiram o valor de R\$23.500,00. Nossos

dados de laboratório ainda estimam que o valor da reação de RT-PCR gira em torno de R\$34,00 por amostra.

Vislumbrando o uso da bactéria *Wolbachia* para minimizar casos de arboviroses em larga escala, bem como sua detecção através das técnicas de PCR, segundo nossas análises, a utilização da ovitrampa como fonte de menor quantidade de amostras necessárias para estimar a invasão da *Wolbachia* parece ser mais viável, em algumas condições de invasão da bactéria, em comparação ao uso das BGS e muito mais interessante para redução de despesas pelos órgãos públicos interessados nessa metodologia de controle.

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu no primeiro ensaio de liberação de mosquitos *Aedes aegypti* em um Simulado de campo da Fiocruz, espaço construído para esse fim. Através dos dados gerados para essa dissertação, podemos afirmar que o experimento foi exequível e demonstrou viabilidade de ensaios com liberações de populações de *Aedes aegypti* com *Wolbachia* em condições de simulação de campo. As fêmeas liberadas neste espaço sobreviveram e conseguiram realizar a postura de seus ovos nas ovitrampas disponibilizadas. Esses ovos foram coletados e serviram de base para o prosseguimento das demais análises propostas. Nossos resultados mostraram que as ovitrampas conseguiram refletir com boa precisão as diferentes frequências testadas, suportando a hipótese de que estas armadilhas podem ser utilizadas para estimar a invasão de *Wolbachia* em campo tão bem quanto as BGS.

Considerando os aspectos econômicos em uma possível substituição das BGS pelas ovitrampas no monitoramento da invasão da *Wolbachia*, com base nas curvas de campo vistas pelas BGs e ovitrampas, nas condições de invasão em torno de 10 e 75%, a viabilidade da utilização das ovitrampas não foi suportada devido o alto valor de erro amostral apresentado, bem como uma maior quantidade de amostras necessárias para gerar uma estimativa mais próxima a observada em campo. Nas situações em que essa invasão representa 25, 50 e 90%, os resultados favorecem o monitoramento pelas ovitrampas, tanto pelo menor custo de implementação dessas armadilhas, comparadas às BGS, quanto pela redução dos gastos com a detecção da *Wolbachia* via qRT-PCR, ao estimar a invasão de modo equivalente às BGS com apenas 15% de larvas analisadas. Nos casos em que a invasão encontra-se em seu estado final (em torno de 90%), parece ser muito mais interessante economicamente, que o monitoramento possa ser feito com apenas 7% do material coletado pelas ovitrampas. Especificamente para a condição de 75% de invasão de *Wolbachia*, o surpreendente alto erro amostral impede conclusões mais assertivas a respeito de sua viabilidade econômica em larga escala, situação que deve ser considerada para estudos posteriores.

Não é indicada a eliminação total das BGS em campo, mas considera-se que à medida que o percentual de invasão da bactéria aumente, reduza-se o número dessas armadilhas para monitoramento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Zamora-Perea E, Luz SLB 2017. Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. *PLoS Med* 14(1):e1002213.

Aliota MT, Peinado SA, Velez ID, Osorio JE 2016. The wMel strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Scientific reports* 6:28792.

Araújo HR, Carvalho DO, Ioshino RS, Costa-da-Silva AL, Capurro ML 2015. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new Technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects* 11; 6(2):576-594.

Bandi C, Trees AJ, Brattig NM 2001. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Vet Parasitol* 12; 98(1-3):215-338.

Bargielowski I, et al 2011. Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* V.6, e20699.

Beaty BJ, Marquadt WC 1996. The biology of disease vectors. University of Colorado Press, Niwot, CO, USA, 630 pp.

Bentley MD, Day JF 1989. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Ann Rev Entomol* 34:401-421.

Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 19:20751.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446):504-7.

Bian G, et al 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* v.6; e1000833,

Binka FN, Indome F, Smith T 1998. Impact of spatial distribution of permethrin-impregnated bed nets on child mortality in rural northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 59:80-85.

Bonat WH, Dallazuanna HS, Ribeiro-Júnior PJ 2009. Investigando fatores associados a contagens de ovos de *Aedes aegypti* coletados em ovitrampas em Recife/PE. *Rev Mat Estat São Paulo* 20(1):1-10.

Bosch OJ, Geier M, Boeckh J 2000. Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. *Chem Senses* 25: 323-330.

Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serviços de Saúde* 16:113-118.

Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serviços de Saúde* 16:279-293.

Braga IA, Valle D 2007c. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 295-302.

Braks MAH, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol* 40:785-94.

Breeuwer JA, Jacobs G 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp Appl Acarol* 20(8):421-434.

Brasil 2009. Guia para gestão local do controle da malária: módulo 2: controle vetorial Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão, Brasília, 59 pp.

Burattini MN, Chen M, Chow A, Coutinho FA, Goh KT, Lopez LF, Ma S, Massad E, 2007. Modelling the control strategies against dengue in Singapore. *Epidemiol Infect* 136:1-11.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Disease* 21:1885-1886.

Caragata EP, Dutra HL, Moreira LA 2016. Exploiting intimate relationships: controlling mosquito-transmitted disease with *Wolbachia*. *Trends Parasitol* 32:207-218.

Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L, et al 2015. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* 9(7):e000386.

Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, et al 2016. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet*; 387:2125-21.

Chavasse DC, Yap HH 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. World Health Organization.

Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al 2016. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 10(3); 11p.

Codeço CT, Lima AWS, Araújo SC, Lima JBP, Maciel-de-Freitas R, Honório NA, et al 2015. Surveillance of *Aedes aegypti*: Comparison of House Index with Four Alternative Traps. *PLoS Negl Trop Dis* 9(2):e0003475.

Consoli RAG, Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 225p.

Cunha SP, Alves JCR, Lima MM, Duarte JR, Barros LCV, Silva JL, Gamarro AT, Monteiro Filho OS, Wanzeler AR 2002. Presença de *Aedes aegypti* em bromeliaceae e depósitos com plantas no Município de Rio de Janeiro. Rev Saúde Públ 36:244-245.

David MR, Lourenço-de-Oliveira R, Maciel-de-Freitas R 2009. Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in a high income dengue epidemic neighborhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. Mem Inst Oswaldo Cruz 104:927-932.

Degener CM 2014. Avaliação das armadilhas MosquiTRAP, BG-Sentinel e BGMosquitito como possíveis ferramentas no controle de *Aedes aegypti* [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

Degener CM, Eiras AE, Azara TMF, Roque RA, Rösner S, et al 2014. Evaluation of the effectiveness of mass trapping with BG-sentinel traps for dengue vector control: a cluster randomized controlled trial in Manaus, Brazil. J Med Entomol 51:408-420.

Denholm I, Devine GJ, Williamson MS 2002. Insecticide resistance on the move. Science 297:2222-2223.

Dick GW 1952. Zika virus II. Pathogenicity and physical properties. Trans R Soc Trop Med Hyg 46:521-34.

Donalisio MR, Freitas ARR 2015. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. Rev Bras Epidemiol 18(1):283-5.

dos Santos BR 2012. Modelos de Regressão Quantílica [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536-43.

Dutra HLC 2014. Aspectos biológicos da infecção pelas cepas wMel e wMelPop de *Wolbachia* sobre Populações Naturais de *Aedes aegypti* do Rio de Janeiro [Dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz.

Dutra HLC, dos Santos LMB, Caragata EP, Silva JBL, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R, et al 2015. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* 9(4):e0003689.

Dutra HLC, da Silva VL, Fernandes MR, Logullo C, et al 2016. The influence of larval competition on Brazilian *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors* 9:282.

Eiras AE 2001. Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos vetores de doenças medico-veterinárias. In: Vilela EF, Della-Lucia TMC, editores. Ferormônios de insetos. 2ª ed. Ribeirão Preto: Holos.

Englbrecht C, Geier M, Venturelli C 2009. Continuous trapping of adult Asian tiger mosquitoes (*Aedes albopictus*) with BG-Sentinel traps reduced the human landing rate and density indices in an urban environment in Cesena, Italy. 5th European Mosquito Control Association Workshop, Turin, Italy.

Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ; Valle D, Rezende GL 2015. 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. *Journal of Insect Physiology* 83:2-10.

Fay RW, Eliason DA 1966. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*: *Mosquito News* 26:531-535.

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

Figueiredo LTM, Fonseca BAL 2005. Dengue. In: FOCACCIA R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 345-358.

Focks DA 2003. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors: UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 38 pp.

Forattini OP 1996. Culicidologia Médica. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo v. 1.

Forattini OP, Marques GRAM 2000. Nota sobre o encontro de *Aedes aegypti* em bromélias. Rev Saúde Pública 34:543-544.

Fournet F, Sannier C, Monteny N 1997. Effects of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). J Am Mosq Control 13:40-42.

Franco O 1976. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Superintendência de Campanhas de Saúde Pública, Ministério da Saúde, Brasil.

Franchini M, Velati C. 5 November 2015. Blood safety and zoonotic emerging pathogens: now it's the turn of Zika virus! Blood Transfus 14:93-4.

Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, van den Hurk A, et al 2014. Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. PloS Negl Trop Dis 20; 8(2):e2688.

Garcia GdA 2017. O papel da resistência a inseticidas e da densidade de *Aedes aegypti* na disseminação da *Wolbachia* em populações nativas do Rio de Janeiro, Brasil [Tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

Garcia GdA, dos Santos LMB, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R 2016. Using *Wolbachia* Releases to Estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Population Size and Survival. PLoS ONE 11(8):e0160196.

Garcia GdA, Sylvestre G, Petersen MT, Aguiar R, Martins AJ, Lima JBP, et al 2017. The riddle solved on a local grocery store: the release of *Aedes aegypti* as resistant to pyrethroid as the wild population is essential for *Wolbachia* releases. In: Garcia GdA 2017. O papel da resistência a inseticidas e da densidade de *Aedes aegypti* na disseminação da *Wolbachia* em populações nativas do Rio de Janeiro, Brasil [Tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

Garziera L, Pedrosa MC, de Souza FA, Gómez M, Moreira MB, Virginio JF, Capurro ML, Carvalho DO 2017. Entomologia Experimentalis et Applicata 164:327-339.

Geier M, Bosch OJ, Boeckh J 1999. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Chem Senses 24:647-653.

Gomes AC 1998. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. IESUS 7(3):49-57.

Gonçalves DS 2014. Detecção da bactéria *Wolbachia* em insetos através da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop) [Dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz.

Gotoh T, Noda H, Hong XY 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spiders mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. Hereditary 91(3):208-2016.

Grard G, Caron M, Mombo IM, et al 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)–2007: a new threat from *Aedes albopictus*? PLoS Negl Trop Dis 8:e2681.

Gubler DJ, Kuno G 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB International. Wallingford, United Kingdom.

Gubler DJ 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.

Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, et al 2016. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *The Journal of Infectious Diseases* 214:1349-56.

Halstead SB 1981. The pathogenesis of dengue. *Molecular Epidemiology in Infections Disease. American Journal of Epidemiology* 114(5):632-648.

Halstead SB 2008. Dengue-virus mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 53:273-291.

Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 31; 322(5902):702.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, et al 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476:454-U107.

Hoffmann AA, Goundar AA, Long SA, Johnson PH, Ritchie SA 2014. Invasion of *Wolbachia* at the residential block level is associated with local abundance of *Stegomyia aegypti*, yellow fever mosquito, populations and property attributes. *Medical and Veterinary Entomology* 28 (Suppl. 1), 90-97.

IOC/Fiocruz – Instituto Oswaldo Cruz/Fundação do Instituto Oswaldo Cruz 2017a [acessado em: 18 de dez 2017]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>

IOC/Fiocruz – Instituto Oswaldo Cruz/Fundação do Instituto Oswaldo Cruz 2017b [acessado em: 20 de dez 2017]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html>

Kimura R, Hotta S 1943. Experimental inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaku*. 3344:1378-1379.

Kline DL 2006. Traps and trapping techniques for adult mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 22:490-496.

Koenker R 2005. *Quantile Regression*. Cambridge University Press.

Kouri GP, Guzman MG, Bravo J 1986. Dengue hemorrágico en Cuba. Crônica de una epidemia. *Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana* 100:322-329.

Kröckel U, Rose A, Eiras AE, Geier M 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J Am Mosq Control Assoc* 22:229-238.

Laven H 1967. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* 2; 16:383-384.

Lea AO, Dimond JB, DeLong DM 1956. Role of diet in egg development by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Science* 123:890-891.

Linss JGB, Brito LP, Azambuja GG, Araki AS, Bruno RV, et al 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites & Vectors*; 7:5.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98:43-54.

Maciel-de-Freitas R, Eiras EE, Lourenço-de-Oliveira 2006. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:321-325.

Maciel-de-Freitas R, Marques WA, Peres RC, Cunha SP, Lourenço-de-Oliveira R 2007. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district in Rio de Janeiro during dry and wet seasons. Mem Inst Oswaldo Cruz 102:489-496.

Maciel-de-Freitas R, Souza-Santos R, Codeco C, Lourenço-de-Oliveira R 2010. Influence of the spatial distribution of human hosts and large size containers on the dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* within the first gonotrophic cycle. Medical and Veterinary Entomology 24:74-82.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Struchiner CJ, Valle D, O'Neill S, Moreira LA 2012. Why do we need 65 alternative tools to control mosquito-borne disease in Latin America? Mem Inst Oswaldo Cruz 107(6):828-829.

Mackay AJ, Amador M, Barrera R 2013. An improved autocidal gravid ovitrap for the control and surveillance of *Aedes aegypti*. Parasites Vectors; 6:13.

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

Marano G, Pupella S, Vaglio S, Liunbruno GM, Grazzini G. 5 November 2015. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. Blood Transfus 14:95-100.

Martínez E 2006. Temas de actualidad. Current topics. Pan American Journal of Public Health, USA, v. 20.

Martinez-Torres ME 1990. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Martí, 180p.

McCarthy M 2016a. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. BMJ 352:i720.

McCarthy M 2016b. Zika virus outbreak prompts US to issue travel alert to pregnant women. *BMJ* 352:i306.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, et al 2009. Stable Introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323(5910):141.

Meira 1916. “Urubaca” gripe ou dengue? *Dengue. Clínica Médica. Gráfica O Estado de São Paulo*; 273-285.

Min KT, Benzer S 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(20):10792-10796.

Montella IR, Martins Jr AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, et al 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77:467-477.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139(7):1268-78.

Morrison AC, Gutierrez EZ, Scott TW, Rosenberg R 2008. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine*. 5:e68.

MS – Ministério da Saúde 2010 – Secretaria de Vigilância em Saúde. Cartilha da Dengue. [acessado em: 02 de dez 2017]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

MS – Ministério da Saúde 2012 – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012). [acessado em 02 de dez 2017]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

MS – Ministério da Saúde 2014 – Secretaria de Vigilância em Saúde. Controle de Vetores. [acessado em: 20 de nov 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>

MS – Ministério da Saúde 2016 – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32, 2016. [acessado em: 13 de nov 2017]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

MS – Ministério da Saúde 2017 – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. [acessado em: 13 de nov 2017]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Musso D, Gubler DJ 2016. Zika virus. Clin Microbiol Rev 29:487-524.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. Medical Journal Armed Forces India 71:67-70.

Nguyen TH, Nguyen HL, Nguyen TY, Vu SN, Tran ND, Le TN, et al 2015. Field evaluation of the establishment potential of wMelPop *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. Parasit & Vectors 28(8):563.

Nobuchi H 1979. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. Journal Clinical Microbiology, Kanpo Rinsho 26:422-425.

Normile D 2013. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. Science 342:415.

Oliveira Sd 2015. Potenciais efeitos da competição interespecífica com *Aedes albopictus* na biologia e disseminação de *Aedes aegypti* com *Wolbachia pipientis* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

Oliveira SL, Carvalho DO, Capurro 2011. Mosquito transgênico: do *paper* para a realidade. Revista da Biologia 6b:38-43.

Osanai CH, Travassos-Da-Rosa APA, Amaral S, Passos ACD, Tauil PL 1983. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 1:53-54.

PAHO – Pan American Health Organization 2017. [acessado em: 16 de dez 2017]. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11599&Itemid=41691&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691&lang=en)

Paupy C, et al 2008. Gene Flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. Rev J Med Entomol 45:91-400.

Pedro A 1923. O dengue em Nictheroy. Brazil Médico 1(13):174-7.

Phuc HK, et al 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. BMC Biol 5; p11.

Powers AM 2018. Vaccine and therapeutic options to control chikungunya virus. Clin Microbiol Rev 31:e00104-16.

Rasgon JL, Scott TW 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. Genetics 165:2029-2038.

Reiter P 2007. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. Vector Borne Zoonotic Dis 7:261-273.

Renault P, et al 2012. Epidemiology of Chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries. Médecine et maladies infectieuses 42(3):93-101.

Ritchie SA, Montgomery BL, Hoffmann AA 2013. Novel estimates of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) population size and adult survival based on *Wolbachia* releases. J Med Entomol 50(3):624-631.

Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, et al 2011. From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. PLoS Negl Trop Dis 5(1):e935.

Rozendal JA 1997. Vector control – methods for use by individual and communities. World Health Organization, Geneva, 413pp.

Sabin AB, Schlesinger RW 1945. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. Science. 101:640-642.

San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, Guzman MG 2010. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. Am J Trop Med Hyg 82:128-135.

Serpa LLN, Costa KV, Voltolini JC, Kakitani I 2007. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. Revista de Saúde Pública 40(6):1101-1105.

Simoes P, Mialdea G, Reiss D, Sagot F, Charlat S 2011. *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. Molecular Ecology Resources 11:567-572.

Staples JE, Breiman RF, Powers AM 2009. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. Clinical Infectious Diseases 49:942-8.

Tantowijoyo W, Arguni E, Johnson P, Budiwati N, Nurhayati PI, Fitriana I, Wardana S, et al 2015. Spatial and Temporal Variation in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Numbers in the Yogyakarta Area of Java, Indonesia, With Implications for *Wolbachia* Releases. Journal of Medical Entomology 53:188-198.

Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. PLoS Bio 23; 6(12): e1000002.

Teixeira MG, Costa MCN, Barreto F, Barreto ML 2009. Dengue: Twenty-five years from its reemergence in Brazil. Cad Saúde Públ 25: S7-S18.

Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS 2000. Insect population control using a dominant repressible, lethal genetic system. Science 287:2474-2476.

Turelli M 2010. Cytoplasmic incompatibility in populations with overlapping generations. Evolution 64:232-241.

Ujvari SC 2003. A história e suas epidemias. A convivência do homem com os microrganismos. Rev Inst Med Trop, São Paulo 45(4):212.

Varejão JBM, et al 2005. Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba 38:238-240.

Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço-de-Oliveira R 2014. High level vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor of the spread of chikungunya. J Virol 88:6294-6306.

Villela DAM, Codeço CT, Figueiredo F, Garcia GA, Maciel-de-Freitas R, Struchiner CJ 2015. A bayesian hierarchical model for estimation of abundance and spatial density of *Aedes aegypti*. PLoS One 23;10(4):e0123794.

Villela DAM, Garcia GdA, Maciel-de-Freitas R 2017. Novel inference models for estimation of abundance, survivorship and recruitment in mosquito populations using mark-release-recapture data. PLoS Negl Trop Dis 11(6):e0005682.

Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M 2017. Global expansion of Chikungunya Virus: Mapping the 64 year history. International Journal of Infectious Diseases 58:69-76.

Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et al 2011. The wMel*Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476(7361):450-3.

Ware GW, Whitacre DM 2004. *The Pesticide Book*. 6<sup>a</sup> Ed. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.

Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, et al 2016. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. *Antiviral Res* 130:69-80.

Werren JH, Baldo L, Clark ME 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6:741-751.

Williams CR, Long SA, Russell RC, Ritchie SA 2006. Field efficacy of the BG-Sentinel compared with CDC Backpack Aspirators and CO<sub>2</sub>-baited EVS traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *J Am Mosq Control Assoc* 22:296-300.

WHO – World Health Organization 2017. Dengue control – Epidemiology. [acessado em: 07 de nov 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>

Xi Z, Khoo CC, Dobson SL 2005. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science* 310(5746):326-8.

Yeap HL, Endersby NM, Johnson PH, Ritchie SA, Hoffmann AA 2013. Body size and wing shape measurements as quality indicators of *Aedes aegypti* mosquitoes destined for field release. *Am J Trop Med Hyg* 89:78-92.

Yen JH, Barr AR 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature* 232:657-58.

Zanluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110:569-72.

Zara AL, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE 2016. *Aedes aegypti* control strategies: a review. Epidemiol Serv Saúde 25(2):391-404.