

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
PRÓXIMO (NIRS) NA DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS E BACTÉRIA
Wolbachia pipientis HERTIG (1936) EM MOSQUITOS *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (LINNAEUS, 1762)

LÍLHA MARIA BARBOSA DOS SANTOS

Rio de Janeiro
Novembro de 2020

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Líha Maria Barbosa dos Santos

Utilização da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) na detecção de arbovírus e bactéria *Wolbachia pipientis* Hertig,(1936) em mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus,1762)

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

RIO DE JANEIRO
Novembro de 2020

Santos, Lilha Maria Barbosa dos.

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) NA DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS E BACTÉRIA *Wolbachia pipientis* HERTIG (1936) EM MOSQUITOS *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS,1762) / Lilha Maria Barbosa dos Santos. - Rio de janeiro, 2020. 81 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Rafael Maciel de Freitas.

Bibliografia: f. 69-81

1. *Aedes aegypti*. 2. Espectroscopia do Infravermelho Próximo. 3. Arbovírus. 4. *Wolbachia*. I. Título.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LÍLHA MARIA BARBOSA DOS SANTOS

**Utilização da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) na detecção de
arbovírus e bactéria *Wolbachia pipientis* Hertig, (1936) em mosquitos *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762)**

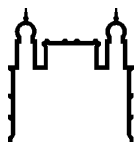
ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

Aprovada em: 27/11/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rafaela Bruno Vieira – Presidente e Revisora (Fiocruz/RJ)
Prof. Dr. Ana Cristina Bahia Nascimento (UFRJ/RJ)
Prof. Dr. Allan Kardec Ribeiro Galardo (IEPA/AP)
Prof. Dr. Clélia Christina Mello-Silva (Fiocruz/RJ)
Prof. Dr. José Joaquim Carvajal Cortes (ILMD/Fiocruz-AM)

Rio de Janeiro, 27 de novembro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Lilha Maria Barbosa dos Santos**, sob orientação do Dr. Rafael Maciel de Freitas. Ao vigésimo sétimo dia do mês de novembro de dois mil e vinte, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **"Utilização da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) na detecção de arbovírus e bactéria Wolbachia pipiensis Hertig, (1936) em mosquitos Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762)"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Ecologia e Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Rafaela Vieira Bruno – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Ana Cristina Bahia Nascimento – UFRJ/RJ, Dr. Allan Kardec Ribeiro Galardo – IEPA/AP e como suplentes: Dr^a. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa - IOC/FIOCRUZ e Dr. José Joaquim Carvajal Cortes - FIOCRUZ/AM. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido - sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 27 de novembro de 2020.

Dr^a. Rafaela Vieira Bruno (Presidente da Banca): 

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa): 

Dedico essa tese à minha mãe
Maria Benedita Barbosa dos Santos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde para chegar até aqui, pois sem Ele certamente eu não teria superado todos os obstáculos que enfrentei durante minha vida e principalmente nestes quatro anos longe de minha família. E por falar em família, agradeço a minha mãe Maria Benedita que tanto me ajudou todos esses anos com suas palavras sábias, sua luta para que eu possa estudar e sua dedicação não só como mãe, mas também como pai desde o momento em que este não esteve mais presente. Agradeço a minha irmã Lídyia Maria por ter aguentado todos os meus estresses e por ser sempre minha companheira.

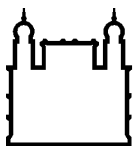
Agradeço ao meu orientador Rafael Maciel de Freitas por tudo que me ensinou, pela paciência e compreensão com os erros cometidos durante este percurso de mais de dez anos, por acreditar em mim e principalmente por reconhecer minha dedicação. Seus ensinamentos foram fundamentais para este projeto. Junto a isso não posso deixar de agradecer também a todos do LATHEMA que colaboraram para este sucesso, me ensinando e ajudando a realizá-lo tanto em campo quanto no laboratório.

A todos meus amigos de Volta Redonda, uma imensa gratidão por sempre estarmos unidos, mesmo com a distância física, isto é muito importante em minha vida. Também agradeço aos meus parentes que moram lá, em Minas Gerais e São Paulo por compreenderem minha ausência nestes anos, mas agora voltarei aos eventos sociais em família, pois ela é a minha base.

Às amigas que conheci na UERJ/FFP eu jamais esquecerei, pois são mais de doze anos que convivemos e mesmo distante posso contar com elas, inclusive neste momento final da minha Tese. As meninas da faculdade que moraram e moram comigo, também fico agradecida pelo acolhimento e pelo que amadureci estando com elas durante este período. Em especial a Jéssica pelos seus conselhos e ajuda psicológica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, FAPERJ e USAID pelo auxílio financeiro.

"Que a coragem seja maior que o medo"
Autor desconhecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

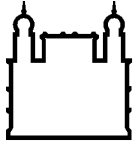
Utilização da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) na detecção de arbovírus e bactéria *Wolbachia pipientis* Hertig (1936) em mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Líha Maria Barbosa dos Santos

A disseminação global acelerada de arbovírus como o dengue (DENV), Zika (ZIKV) e o chikungunya (CHIKV) destaca a necessidade de ações proativas na vigilância de mosquitos potencialmente infectados. No entanto, um grande desafio durante surtos de arbovírus tem sido a falta de soluções rápidas como testes diagnósticos para detecção imediata de patógenos em mosquitos. Mostramos pela primeira vez que a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) é uma ferramenta rápida e econômica que pode ser usada para detectar ZIKV de forma não invasiva em cabeças e tórax de mosquitos *Aedes aegypti* intactos com acurácias de 94,2 a 99,3% em relação a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR). Seu baixo custo decorre da inexistência de materiais de consumo para o diagnóstico, mas envolve a coleta de um espectro na faixa do infravermelho após lançar um feixe de luz sob o inseto. Estimamos que o NIRS é 18 vezes mais rápido e 110 vezes mais barato do que RT-qPCR quando analisamos um primeiro estudo com mosquitos frescos. Avaliamos a precisão, sensibilidade e especificidade da NIRS na estimativa do tempo pós-morte, infecção por ZIKV, CHIKV e *Wolbachia* em fêmeas de *Ae. aegypti* aprisionadas por um período de 7 dias em armadilha BG sentinela, em ambiente de laboratório. Independentemente do tipo de infecção, o tempo pós-morte dos mosquitos foi previsto com precisão em quatro categorias (fresco, com 1 dia, 2-4 dias e 5-7 dias). Precisoões gerais de 93,2, 97 e 90,3% foram observadas quando NIRS foi usado para detectar ZIKV, CHIKV e *Wolbachia* em fêmeas de *Ae. aegypti* a até 7 dias pós morte. A NIRS poderá ser expandida para melhorar os sistemas de vigilância de arbovírus identificando pontos de acesso de arbovírus para orientar a priorização espacial do controle de vetores.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) to detect arboviruses and bacteria *Wolbachia pipientis* Hertig (1936) in mosquitoes *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Líha Maria Barbosa dos Santos

The accelerated global spread of arboviruses such as dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) highlights the need for proactive actions in the surveillance of potentially infected mosquitoes. However, a major challenge during arbovirus outbreaks has been a lack of quick solutions like diagnostic tests for detecting pathogens in mosquitoes. We have shown for the first time that near-infrared spectroscopy (NIRS) is a fast and economical tool that can be used to non-invasively detect ZIKV in the heads and thorax of intact *Aedes aegypti* mosquitoes with accuracy from 94.2 to 99.3% regarding the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). Its low cost stems from the lack of consumables for the diagnosis, but it involves the collection of a spectrum in the infrared range after launching a beam of light under the insect. We estimate that NIRS is 18 times faster and 110 times cheaper than RT-qPCR when we analyzed a first study with mosquito frescoes. We evaluated the accuracy, sensitivity and specificity of the NIRS in the estimation of the postmortem time, infection by ZIKV, CHIKV and *Wolbachia* in second of *Ae. aegypti* trapped for a period of 7 days in a BG sentinel trap, in a laboratory environment. Regardless of the type of infection, the mosquitoes' postmortem time was accurately predicted in four categories (fresh, 1 day, 2-4 days and 5-7 days). General precision of 93.2, 97 and 90.3% was observed when NIRS was used to detect ZIKV, CHIKV and *Wolbachia* in second of *Ae. aegypti* dead up to 7 days after death. NIRS can be expanded to improve arbovirus surveillance systems by identifying arbovirus access points to guide spatial prioritization of vector control.

ÍNDICE

1	Introdução.....	1
1.1	Vetor: Características gerais.....	1
1.2	Vírus: Histórico e aparecimento no Brasil.....	6
1.3	Controle.....	9
1.3.1	Controle físico/mecânico.....	11
1.3.2	Controle químico.....	13
1.3.3	Controle biológico.....	15
1.4	Alternativas de controle.....	16
1.4.1	Inseticidas Reguladores de Crescimento.....	16
1.4.2	Mosquitos Transgênicos.....	17
1.4.3	Mosquitos irradiados.....	18
1.4.4	Bactéria <i>Wolbachia</i>	18
1.5	Vigilância.....	20
1.6	Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS).....	22
1.6.1	Histórico e Teoria.....	22
1.6.2	Aplicações.....	27
1.7	Justificativa.....	29
2	Objetivos.....	31
2.1	Objetivo Geral.....	31
2.2	Objetivos Específicos.....	31
3	Resultados.....	32
3.1	Rapid, noninvasive detection of Zika virus in <i>Aedes aegypti</i> mosquitoes by near-infrared spectroscopy.....	32
3.2	High throughput estimates of <i>Wolbachia</i> , Zika and chikungunya infection in <i>Aedes aegypti</i> by Near-infrared spectroscopy to improve disease surveillance.....	32
4	Discussão.....	33
5	Conclusões.....	39
6	Referências Bibliográficas.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i> , representando seus quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto.....	1
Figura 2: <i>Aedes aegypti</i> : potencial de distribuição marcadamente mais amplo nas regiões tropicais e subtropicais. Em azul (código 1) ampla distribuição e em cinza (código 0) menor distribuição do vetor.....	5
Figura 3: Estimativa da distribuição global de dengue, Zika e chikungunya.....	6
Figura 4: Estabelecimento da bactéria <i>Wolbachia</i>	20
Figura 5: Comprimento de onda e frequência mostrando que quanto menor o comprimento de onda, maior será a frequência e vice versa.....	22
Figura 6: Experimento de Frederic Willian Herschel.....	23
Figura 7: Espectro Eletromagnético mostrando a localização da região do infravermelho.....	24
Figura 8: Exemplo de modos vibracionais dos átomos de moléculas podendo ser por estiramento simétrico, estiramento assimétrico ou dobramento.....	25
Figura 9: Exemplo de um espectro de absorção NIR de uma amostra orgânica com picos de comprimentos de ondas das moléculas presentes.....	26

Lista de Siglas e Abreviaturas

AHJ - Análogos do Hormônio Juvenil

Arbovírus - Arthropod borne vírus

AUL - Asiático

Bti- *Bacillus thuringiensis israelensis*

CHIKV – vírus Chikungunya

DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DENV – vírus Dengue

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ECSA – *East-Central South African*

IIP - Índice de Infestação Predial

IB - Índice de Breteau

IGR – *Insect Growth Regulator*

IOL - Indian Ocean

OMS - Organização Mundial de Saúde

OP – Organofosforado

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PEAa - Plano de Erradicação do *Ae. aegypti*

PIACD - Plano de Intensificação das Ações de Controle de Dengue

PIE - Período de incubação extrínseco

PNCD - Programa Nacional de Controle da Dengue

PPF – Pyriproxifen

PY - Piretróide

RIDL - *Release of Insects containing Dominant Lethal gene*

RNA – Ácido Ribonucleico

SIT – *Sterile Insect Technique*

NIRS – *Near-Infrared Spectroscopy*

WA - *West Africa*

ZIKV – *virus Zika*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vetor: Características gerais

Os animais invertebrados que possuem exoesqueleto formado principalmente por quitina, corpo segmentado, e apêndices articulados pertencem ao Filo Arthropoda. Tais animais compõem o grupo de maior biodiversidade do planeta. Por uma série de razões detalhadamente discutidas abaixo, existe especial interesse em alguns grupos e espécies organizados na Classe Insecta, especificamente na Ordem Diptera (Barnes *et al.* 2005).

Os mosquitos são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa ao longo de seu desenvolvimento que é dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). O estágio de larva pode ser subdividido em quatro estádios larvares, comumente denominados L1-L4. Após L4, alcança-se o estágio de pupa, onde enfim acontece a metamorfose que resulta no inseto adulto (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

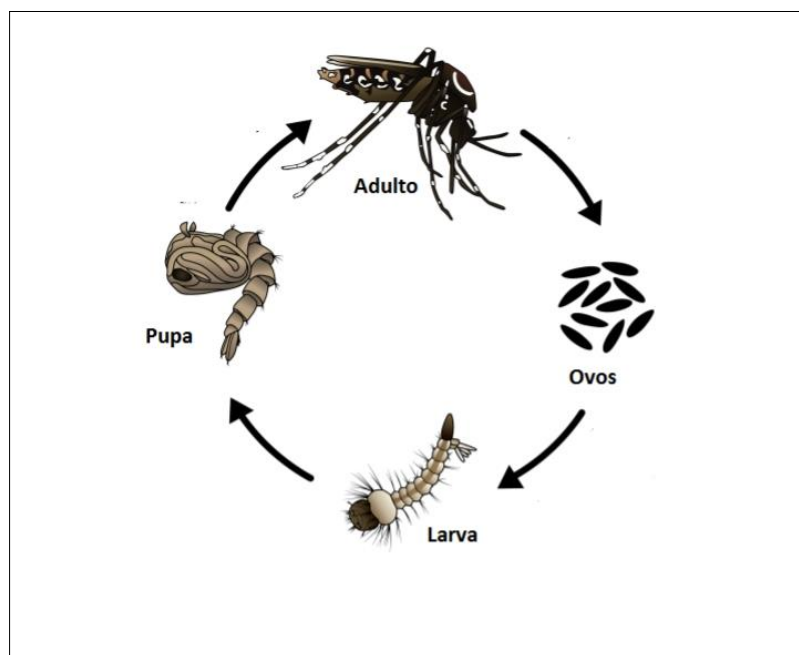


Figura 1: Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*, representando seus quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Adaptado de Fundação Oswaldo Cruz.

Os ovos têm formato elíptico ou ovais e com coloração pálida na postura, escurecendo após alguns minutos. Conforme o gênero, o mosquito pode colocar os ovos de forma que estes fiquem isolados ou em conjunto; direto sobre a água, nos substratos flutuantes das águas ou em lugar com umidade alta próxima a água.

Quando na ausência de água o ovo pode entrar em diapausa que é o tempo em dias após o desenvolvimento embrionário em que ocorre a suspensão temporária da eclosão. Este tempo é estimado de acordo com a espécie podendo variar, por exemplo, de 10 dias para *Anopheles gambiae* (Giles 1902) a cerca de um ano para *Aedes aegypti* (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Farnesi *et al.* 2015).

Nas larvas, a divisão corpórea é cabeça, tórax (protórax, mesotórax e metatórax) e abdome (nove segmentos) e apresentam mais de 200 pares de cerdas com função sensorial e de flutuação. O aparelho bucal é mastigador-raspador, possuem escovas a frente da cabeça que fazem correntes hídricas para levarem as partículas que serão mastigadas até a boca. Sendo assim, as larvas são filtradoras, detritívoras e capazes de consumir qualquer matéria orgânica presente em seu criadouro, como por vezes recorrer ao canibalismo quando os recursos são escassos. O armazenamento de proteínas e glicogênio é feito no corpo gorduroso e vão servir para o desenvolvimento dos próximos estágios, pupa e adulto. Em relação a respiração, mesmo vivendo na água, as larvas utilizam o oxigênio do ar. Para isto, dependendo da espécie, podem adotar diferentes estratégias, como por exemplo ficar de maneira horizontal à superfície da água e com os espiráculos voltado para cima para adquirir o ar necessário ou mesmo sifão respiratório para captar o oxigênio direto do ar como Culicinae (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

Após o estágio de larva, o próximo é o de pupa. Seu corpo tem forma de vírgula, dividido em cefalotórax (cabeça e tórax) e abdome. Não ocorre ingestão de alimento, com característica de ficar por muito tempo imóvel na superfície da água, porém se movimentam ligeiramente quando incomodadas. Sua movimentação se dá pela presença de um par de pás presente ao final do abdome (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

Nos adultos, a divisão corpórea é a cabeça, composta por olhos, antenas e palpos; tórax, contendo 3 pares de pernas e 2 pares de asas para a locomoção com um par modificado em halteres para orientação e equilíbrio; abdome, que internamente tem os aparelhos reprodutor, digestivo e excretor. Os segmentos dos mosquitos possuem membranas (pleura) para uni-los e juntos envolvem a hemocele que é uma cavidade com hemolinfa, um líquido que banha os órgãos. Os segmentos são divididos em três escleritos, os dorsais que são os tergitos, os ventrais que são os esternitos e os laterais que são os pleuritos. As antenas contribuem para a identificação do sexo sendo a do macho com mais pelos e por isso chamada de plumosa e a das fêmeas com menos chamada de pilosa. Os palpos também ajudam a diferenciar o sexo, pois na maioria das espécies eles tem o mesmo tamanho ou

são maiores que a probóscide nos machos e nas fêmeas são mais curtos, exceto na subfamília Anophelinae (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

Na maioria dos mosquitos adultos as fêmeas precisam de alimentação sanguínea para, com os metabólitos decorrentes da digestão sanguínea, iniciar o processo de embriogênese. Vale ressaltar que somente as fêmeas são hematófagas, enquanto os machos se alimentam somente de carboidratos adquiridos de seivas, flores e frutos. Quando o sangue chega ao estômago das fêmeas, uma membrana peritrófica é formada e é através dela que enzimas atravessarão para realizar a digestão sanguínea. (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

O grande número de estudos envolvendo os dípteros, frente aos demais insetos, em muito se baseia pelo seu envolvimento na transmissão de patógenos, o que impacta na saúde pública. Os mosquitos são insetos que pertencem à Família Culicidae, possuem duas importantes sub-famílias: Anophelinae e Culicinae. Tal importância se deve, principalmente, ao fato de que muitas espécies destas sub-famílias podem atuar como transmissoras de patógenos ao ser humano (Barnes *et al.* 2005). Na primeira, encontram-se os mosquitos transmissores do vírus O'nyong-nyong (Williams *et al.* 1965) e do protozoário *Plasmodium*, enquanto que na segunda encontram-se os mosquitos transmissores dos arbovírus (do inglês **arthropod borne virus**) dengue, Zika, febre amarela urbana, chikungunya e também podem transmitir filárias como *Wuchereria bancrofti* (Rey 2008) e *Dirofilaria sp* (Silva e Langoni 2009).

Dentre as espécies da família Culicinae, provavelmente o *Aedes aegypti* é a mais estudada dado seu papel na transmissão de arboviroses. Oriundo do Egito, na África, acredita-se que tenha sido introduzido pela primeira vez no Brasil e em outros países das Américas provavelmente durante o período colonial, concomitante ao tráfico de escravos. A duração do seu desenvolvimento, ou seja, o período decorrido entre a eclosão do ovo até o surgimento do adulto, é de cerca de doze dias. Entretanto, esse período é amplamente dependente da temperatura e da oferta de recursos alimentares no criadouro. O desenvolvimento dos imaturos é acelerado quando temperaturas elevadas são observadas, assim como em maior oferta de alimentos (Alto *et al.* 2008a).

Os imaturos, por viverem em ambiente aquático, não competem com adultos por recursos, característica importante que pode ter auxiliado no sucesso evolutivo deste grupo. As fêmeas adultas desta espécie têm a necessidade de alimentação sanguínea para desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovos, mas podem recorrer à alimentação açucarada disponível em vegetais para seu metabolismo

(Edman *et al.* 1998, Harrington *et al.* 2001). Cerca de 3-4 dias após a alimentação sanguínea, a fêmea busca um sítio para realizar a postura de seus ovos. Dependendo do índice de infestação numa localidade, pode-se esperar maior ocorrência de desova de várias fêmeas em um único depósito, gerando assim diferentes intensidades de competição intra e às vezes até interespecífica com *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse 1894), predominantemente, mas também com *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), *Limatus durhami* (Theobald, 1901) e *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) em menor proporção (Harrington & Edman 2001, Honório e Lourenço-de-Oliveira 2001).

O tamanho dos adultos é uma consequência natural da qualidade do ambiente a qual os imaturos foram submetidos. Em ambientes com rica oferta de recursos alimentares e baixo adensamento larval, haverá baixa competição entre os indivíduos, resultando no aparecimento de adultos maiores, menor mortalidade larval e surgimento sincronizado dos adultos. Por outro lado, quando os recursos são limitados e há grande adensamento, presencia-se maior competição larval, cujo resultado é a produção de indivíduos menores, maior mortalidade larval e baixo sincronismo na eclosão dos adultos. Alguns artigos têm mostrado que maior intensidade na competição intra e interespecífica (com *Ae. albopictus*) aumenta a susceptibilidade e a taxa de disseminação do vírus dengue em *Ae. aegypti* (Alto *et al.* 2005, 2008a, 2008b). As fêmeas menores se alimentam mais vezes quando comparamos com as maiores (Scott *et al.* 2000), o que pode aumentar a transmissão de vírus a hospedeiro susceptível, caso esta esteja infectada.

O *Ae. aegypti* é um mosquito intimamente associado ao ambiente humano, com hábito alimentar endofílico e antropofílico, possui marcada preferência por se alimentar de sangue humano e realizar a postura de seus ovos em recipientes artificiais geralmente localizados nos arredores de habitações humanas (Cunha *et al.* 2002, Maciel-de-Freitas *et al.* 2007). Devido a essa grande associação com os seres humanos, o *Ae. aegypti* é um mosquito encontrado de maneira mais abundante em áreas urbanas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Maciel-de-Freitas *et al.* 2007).

Este mosquito possui o pico de atividade nos crepúsculos matutino e vespertino (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Chamamos de período de incubação extrínseco (PIE) o tempo em dias que o vírus demora para, após a ingestão de uma alimentação sanguínea infectada, alcançar a glândula salivar do vetor (Gubler e Kuno 1997). Cerca de 7-10 dias após uma fêmea de *Ae. aegypti* se alimentar com sangue contendo partículas do vírus dengue, esse indivíduo

pode transmitir o vírus para novos hospedeiros em que realizar a alimentação sanguínea (Salazar *et al.* 2007).

Alguns relatos recentes têm demonstrado que a área de distribuição geográfica desta espécie vem se expandindo (Figura 2). O *Ae. aegypti* já pode ser encontrado em densidade alta em países como Argentina e Uruguai, na América do Sul e sul dos Estados Unidos (Braks *et al.* 2003, Halstead 2008). Acredita-se que foi erradicado no Brasil, mas não no Caribe e países vizinhos em 1958 (Lounibos 2002, Monteiro *et al.* 2014). Com as condições climáticas favorecendo seu desenvolvimento e reprodução, esta espécie conseguiu recolonizar o país em 1980 (Penna 2003, Monteiro *et al.* 2014). A urbanização acelerada e desorganizada nas cidades também foram fatores que contribuíram para o aumento da densidade do *Ae. aegypti* (Weaver e Reisen 2010).

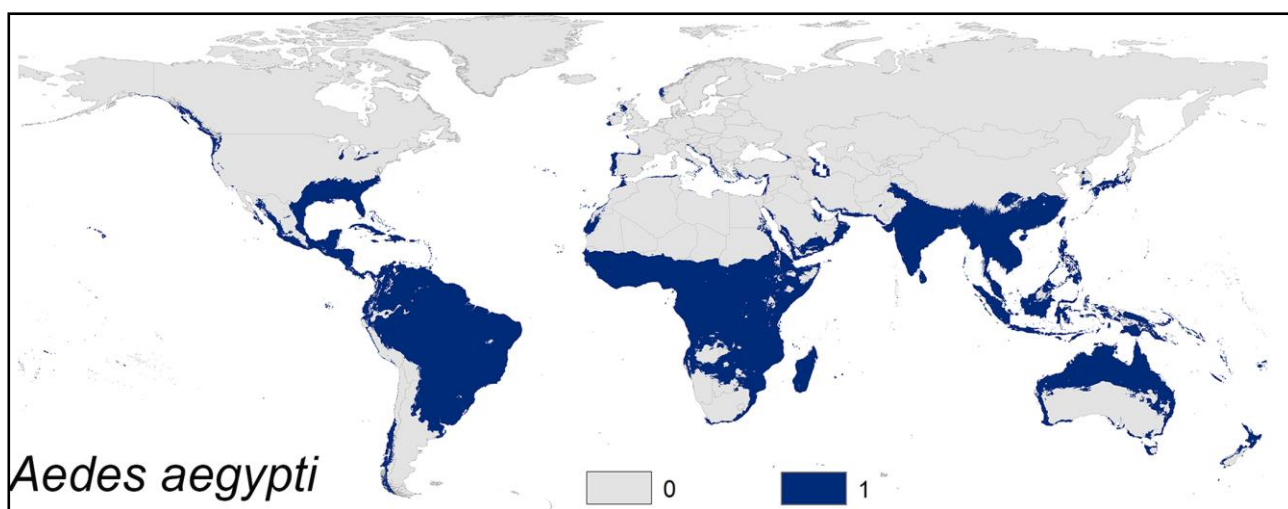


Figura 2: *Aedes aegypti*: potencial de distribuição marcadamente mais amplo nas regiões tropicais e subtropicais. Em azul (código 1) ampla distribuição e em cinza (código 0) menor distribuição do vetor. Adaptado de Kamal 2018.

Estudos de genética de populações tem ajudado a entender a origem e biogeografia do *Ae. aegypti*. Estudos de sequência de DNA mitocondrial de várias populações brasileiras revelaram a coocorrência de duas linhagens distintas em nosso país (Bracco *et al.* 2007, Scarpassa *et al.* 2008). Monteiro e colaboradores (2014) também mostraram que a população brasileira de *Ae. aegypti* é separada por dois grupos genéticos. Um é formado por populações da Região Norte e Nordeste e é geneticamente mais semelhante com a população de mosquitos da América Central e sul dos EUA. Outro grupo, por sua vez, formado por populações brasileiras localizadas no sul da Região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileiro, mais se assemelha com populações da Dominica no Caribe.

1.2 Vírus: Histórico e aparecimento no Brasil

Desde os anos 1980, o vírus dengue (DENV) pode ser apontado como o principal arbovírus presente no Brasil no que diz respeito a mortalidade e morbidade. A circulação dos vírus chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) no Brasil foi detectada em 2014/2015 nos estados do Rio Grande do Norte (Zanluca *et al.* 2015), Amapá e Bahia (Campos *et al.* 2015, Nunes *et al.* 2015; Zammarchi *et al.* 2015), evidenciando a vulnerabilidade de milhões de brasileiros que vivem nos centros urbanos, apesar dos programas de vigilância epidemiológica e controle vetorial implantados no país. Na figura 3 encontra-se a distribuição global dessas três arboviroses (Patterson *et al.* 2016).

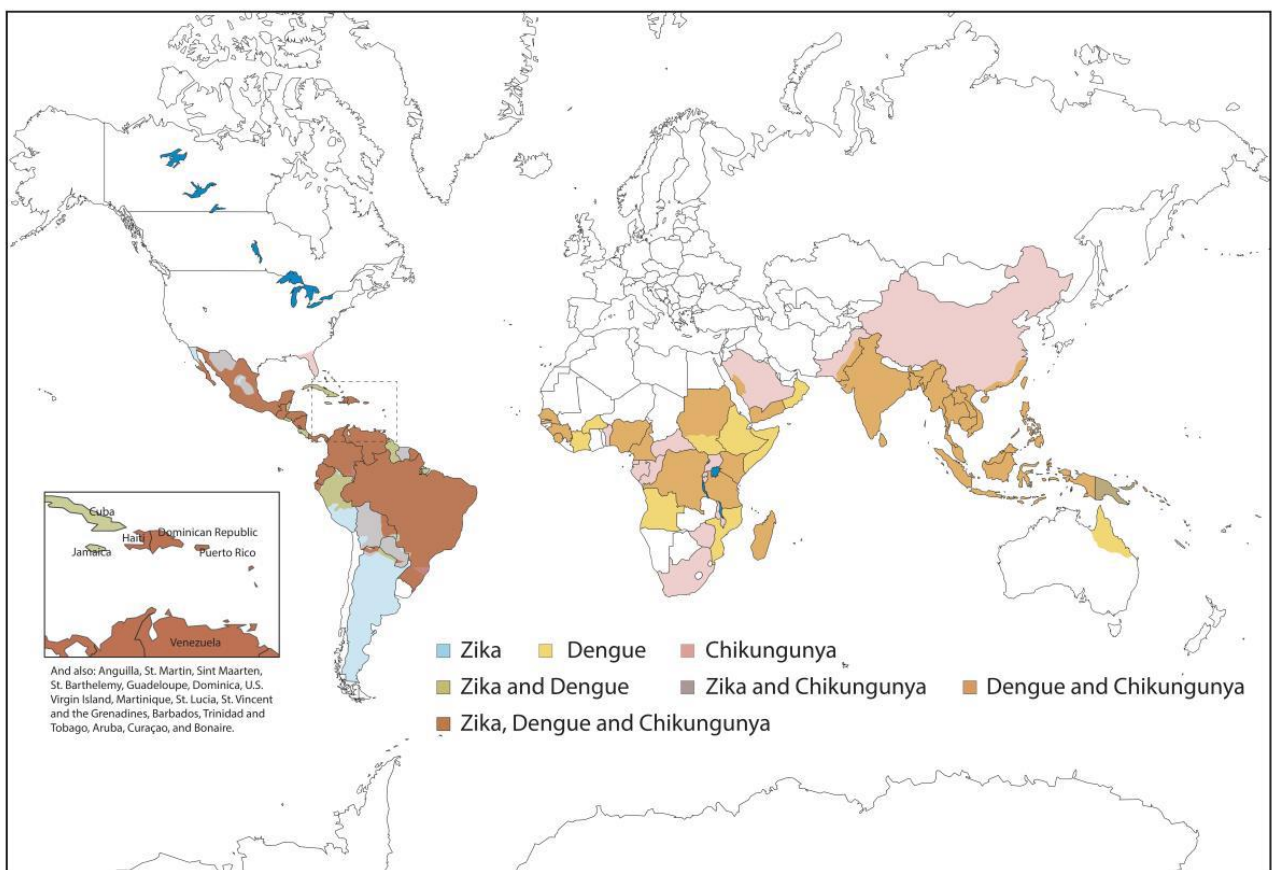


Figura 3: Estimativa da distribuição global de dengue, Zika e chikungunya (Patterson *et al.* 2016).

Um dos primeiros microrganismos a serem denominados vírus foi o Dengue em 1907, e seu isolamento ocorreu na década de 1940 (Barreto e Teixeira 2008). Este flavivírus causa a dengue e pode apresentar-se sob quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados DENV-1, -2, -3 e -4. O vírus apresenta morfologia esférica com 40 a 60 nm de diâmetro, contendo um *core* de simetria icosaédrica envolto por envelope lipídico. O genoma viral é constituído por RNA de

fita simples com aproximadamente 11.000 pares de base e polaridade positiva (Miller *et al.* 2010).

O isolamento do vírus dengue ocorreu em 1943 por Kimura Susumo Hotta durante uma epidemia de dengue em Nagasaki, eles deram o nome a esta cepa de Mochizuki. Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa Havaí, e Sabin, no mesmo ano, identificou em soldados que vieram de Nova Guiné outro vírus e verificou que as cepas tinham características antigênicas diferentes e passaram a considerarem que eram sorotipos do mesmo vírus. Então, ele denominou de sorotipo 1 às primeiras cepas e de sorotipo 2 a de Nova Guiné (Halstead 2002, Barreto e Teixeira 2008). Já em 1956 com uma epidemia de dengue hemorrágica no Sudeste Asiático os sorotipos 3 e 4 foram isolados (Martinez-Torres 1990).

Em 1982 no Brasil, em Boa Vista (Roraima) ocorreu a primeira epidemia com os sorotipos DENV-1 e DENV-4, com entrada viral provavelmente pela Venezuela, mas com contenção do patógeno (Osanai 1984). Em 1986 o DENV-1 foi isolado em Nova Iguaçu (Rio de Janeiro) e a partir daí foi disseminado para as cidades vizinhas. Ele também foi detectado em outros estados neste mesmo ano e no seguinte (Teixeira *et al.* 1999). Em 1990 houve a introdução do DENV-2 em Nova Iguaçu (RJ) (Teixeira *et al.* 2005) e nos anos subsequentes DENV-1 e 2 ampliaram sua expansão geograficamente concomitante ao aumento na distribuição do *Ae. aegypti* (Barreto e Teixeira 2008). Em 2001 foi registrada a introdução do DENV-3 no Rio de Janeiro (Nogueira *et al.* 2005), sendo este o causador da grande epidemia em 2002.

O DENV-4 foi novamente detectado em Roraima em julho de 2010, com uma epidemia de DENV-1 e DENV2 em curso, e talvez por isso não foram registrados mais do que duas dezenas de casos vinculados a este sorotipo (Maciel-de-Freitas *et al.* 2014). Após seu reaparecimento, rapidamente alcançou mais dois Estados da região Norte, Amazonas e Pará, em janeiro 2011 e em seguida foi detectado em outros estados inclusive o Rio de Janeiro com o primeiro caso detectado no bairro de Cafubá, município de Niterói. Subsequentemente, novos casos foram detectados no bairro de São Domingos, também em Niterói (Nogueira e Eppinghaus 2011).

Podemos observar que a cada introdução de um sorotipo ocorrem epidemias porque, quando há entrada de um novo sorotipo, ou emergência de um sorotipo que não circula há muitos anos, o número de hospedeiros susceptíveis na população humana é alto (Focks 1995). Atualmente, todos os quatro sorotipos encontram-se disseminados pelo país (Fares *et al.* 2015). As pessoas que vivem em áreas endêmicas de dengue podem se infectar com mais de um sorotipo ao longo da vida

uma vez que a imunidade não é cruzada para os outros. A imunidade apenas é permanente para o sorotipo que causou a infecção (Gubler 1998)

Anualmente, estima-se que ocorram 50-100 milhões de infecções pelo dengue, com cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em países endêmicos (Bhatt *et al.* 2013). Apesar de quase metade da população humana encontrar-se sob risco de infecção, os casos de dengue concentram-se nas zonas tropicais do planeta, onde os mosquitos vetores estão em maior densidade (Bhatt *et al.* 2013). A grande incidência de dengue causa impacto na economia e saúde global, com custo anual médio de 2,1 bilhões de dólares apenas nas Américas (Shepard *et al.* 2011).

A febre de chikungunya é uma arbovirose causada pelo CHIKV, da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*. É um vírus RNA fita simples e positiva e apresenta três diferentes genótipos: Oeste da África (WA), Leste-Centro-Sul da África (ECSA, sigla em inglês), Asiático (AUL) e Oceano Índico (IOL). O nome “chikungunya” significa “aquele que se dobra” devido à forte dor nas articulações daqueles infectados (Enserink 2007). Enquanto na dengue os sintomas podem desaparecer em algumas semanas, em chikungunya é possível que permaneça anos dependendo da pessoa (Robinson 1955).

O CHIKV foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, em 1952. Desde então, houve relatos de surtos em vários países da África e Ásia, até que, em outubro de 2013, o CHIKV chegou às Américas pelo Caribe, resultando em milhares de infecções (Nunes *et al.* 2015). Este vírus pode circular nas florestas entre primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes*, África (Higgs e Vanlandingham 2015). No Brasil, a transmissão autóctone foi detectada em setembro de 2014, nas cidades de Oiapoque (Amapá) e Feira de Santana (Bahia) (Nunes *et al.* 2015), onde os genótipos virais circulantes pertencem às linhagens asiática e africana-ECSA (*East Central South Africa*), respectivamente (Nunes *et al.* 2015). Este último está disseminado pelo país e associado ao surto acontecido no Rio de Janeiro em 2016 (Costa-da-Silva *et al.* 2017).

O ZIKV é um flavivírus da família *Flaviviridae*, RNA fita simples e positiva que foi originalmente isolado de um macaco *Rhesus* sentinela na Floresta Zika, na Uganda, em 1947 (Dick *et al.* 1952). Ele se apresenta em três linhagens principais denominadas de acordo com a sua origem geográfica: Leste da África, Oeste da África e Asiática (Faye *et al.* 2014). Em 2013-14, uma epidemia se instaurou na Polinésia Francesa, com uma estimativa de 19 mil casos suspeitos (Cao-Lormeau *et al.* 2014). Os primeiros casos confirmados no Brasil ocorreram em fevereiro de 2015 na Bahia (Campos *et al.* 2015) e logo em seguida foram detectados novos casos em

diversos Estados, mostrando uma grande capacidade de disseminação (Zanluca *et al.* 2015).

No Brasil, o ZIKV que circula se aproxima geneticamente ao que já foi identificado na Polinésia Francesa. O sequenciamento dessa amostra revela que pertence à linhagem Asiática e especula-se que possa ter sido introduzido em nosso país durante grandes eventos ocorridos nesse período, como um evento internacional de canoagem de 2013 ou mesmo a Copa do Mundo da Fifa em 2014 (Zanluca *et al.* 2015, Musso 2015). Atualmente o vírus apresenta transmissão autóctone por todo o país. Em 2015, a Organização Mundial da Saúde classificou a epidemia da febre do Zika como uma emergência em saúde pública mundial por causa da associação do ZIKV com casos de microcefalia em neonatos (Schule-Faccini *et al.* 2016), um aumento de 20 vezes nos casos de microcefalia registrados em relação aos anos anteriores (Calvet *et al.* 2016). Em populações que já possuem imunidade para outros flavivírus, como o DENV, casos de infecções por ZIKV podem ocorrer erros em ensaios sorológicos, contribuindo para o diagnóstico equivocado da doença (Lanciotti *et al.* 2008).

1.3 Controle

As três arboviroses supracitadas têm sua incidência influenciada por fatores bióticos e abióticos que agem sobre um ou mais de seus três elementos: hospedeiro vertebrado (humanos), vetor (mosquito) e agente etiológico (vírus). Após debates em relação à transmissão do ZIKV, cresce o consenso de que o mosquito *Aedes aegypti* é o vetor primário dos três arbovírus: DENV, CHIK e ZIKV (Vega-Rúa *et al.* 2015, Fernandes *et al.* 2016). Esse mosquito apresenta elevada capacidade vetorial, visto que está amplamente adaptado ao ambiente urbano, possui alta competência aos arbovírus e tem preferência por picar seres humanos (Lourenço-de-Oliveira R *et al.* 2004, Vega-Rúa *et al.* 2015, Fernandes *et al.* 2016). Uma vez que ainda não existem medicamentos antivirais específicos e vacinas eficientes amplamente disponíveis para a população, a melhor forma de reduzir a transmissão de DENV, CHIK e ZIKV é a intensificação das atividades de controle de seu vetor, o *Ae. aegypti*. No Brasil, o emprego de métodos tradicionais de controle tais como eliminação de criadouros e aplicação de inseticidas ainda constituem a principal ação de controle. Entretanto, possuem importantes limitações (Maciel-de-Freitas *et al.* 2014, Maciel-de-Freitas e Valle 2014). O controle mecânico consiste na modificação do ambiente e na eliminação de criadouros, mas é uma atividade intensa.

O controle do vetor ajuda na redução da transmissão de patógenos porque com a diminuição da densidade populacional do *Ae. aegypti* conseqüentemente haverá menor contato entre o homem e o mosquito.

No Brasil, uma importante campanha de controle do *Ae. aegypti* a respeito do papel dos mosquitos na transmissão de microrganismos causadores de doenças foi empreendida no início do século passado liderada pelo médico sanitário Oswaldo Cruz (Franco 1969), cuja função era detectar casos de febre amarela e eliminar focos do vetor (Braga e Valle 2007a). Com o apoio da Fundação Rockefeller em um esforço coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde, o Brasil foi considerado livre do *Ae. aegypti* apenas em 1955, quando o último foco do mosquito foi eliminado no Município de Santa Terezinha, na Bahia (Franco 1969). O êxito dessa empreitada não foi compartilhado por países vizinhos ou que apresentavam comércio ou fluxo de viajantes com o Brasil, como Venezuela, Cuba e Estados Unidos (Braga e Valle 2007a).

A Sucam (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública) foi criada no ano de 1967, ela assumiu as funções do Departamento Nacional de Endemias Rurais que tinha como funções as ações de combate a febre amarela e malária. Neste mesmo ano houve novamente a ocorrência do *Ae. aegypti* e seis anos mais tarde, em 1973, mais uma vez, ele foi considerado erradicado. Entretanto o vetor foi reintroduzido em nosso país após a descoberta de um foco na cidade de Salvador (Braga e Valle 2007a) no ano de 1976. Acredita-se a vigilância entomológica teve falha e, junto a isso, um processo de urbanização descontrolada já experimentada nos anos 1970 tenha tido grande efeito nessa reintrodução (WHO 1997). Desde então, o *Ae. aegypti* se tornou endêmico no Brasil, causando epidemias de dengue com periodicidade de aproximadamente 4-5 anos desde o início dos anos 1980 (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Barreto e Teixeira 2008).

Em 1990, com um dos objetivos de coordenar as ações de controle da dengue empreendidas pelo Ministério da Saúde (MS), tivemos a criação da Funasa (Fundação Nacional de Saúde). Seis anos depois, também criado pelo MS, foi o Plano de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa), mas que logo foi desacreditado devido à dificuldade logística e operacional em se obter êxito. Em 2001 o objetivo deixava de ser a erradicação e começava a ser a manutenção de atividades de controle nos municípios que apresentaram maior número de casos de dengue entre 2000-2001, quando foi implantado o Plano de Intensificação das Ações de Controle de Dengue (PIACD) (Braga e Valle 2007b). Para melhorar e continuar o PIACD, houve a criação em 2002 do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), objetivando a

capacitação das secretarias estaduais e municipais, determinação das orientações relacionadas ao controle vetorial, classificação de casos e definição dos métodos de controle empregados (PNCD 2002).

O foco principal em uma atividade de controle vetorial é manter a densidade populacional do mosquito abaixo de um limite teórico de transmissão onde, por exemplo, epidemias de dengue seriam evitadas (Focks 2003). Existem algumas abordagens de controle disponíveis para o *Ae. aegypti*, seja em sua forma imatura ou alada. Pode-se utilizar as alterações em seu habitat (controle mecânico), compostos xenobióticos (controle químico), outras espécies de seres vivos (controle biológico), organismos transgênicos, com liberação em campo de mosquitos inférteis ou incapazes de transmitir patógenos (controle genético) (Rozendaal 1997). Cada uma dessas alternativas possui seus prós e contras e, sabidamente, podem e devem ser utilizados de maneira integrada, onde gestores devem levar em consideração as características positivas e negativas de modo a criar uma estratégia integrada de controle com maior eficácia.

Apesar das armadilhas poderem ser apontadas como sendo mais uma ferramenta de controle do vetor, isso deve ser analisado com cautela porque a logística relacionada ao uso massivo de armadilhas em campo parece ilógico frente aos seus benefícios (Kröckel *et al.* 2006, Degener *et al.* 2014). Desta maneira, o uso de armadilhas ainda deve ser restrito ao monitoramento, direcionando, assim, as atividades de controle e apontando em quais regiões de uma localidade há maior risco de transmissão de arbovírus. Outra possibilidade de estudos associada ao uso de armadilhas é, por exemplo, avaliação da eficácia de medidas de controle tais como redução de criadouros e aplicação de inseticidas (larvicida e/ou adulticidas) a partir do monitoramento comparativo do tamanho da população antes e depois da prática de intervenção adotada (Maciel-de-Freitas *et al.* 2014).

1.3.1 Controle físico/mecânico

O controle mecânico consiste na modificação do ambiente e na eliminação de criadouros, o que conseqüentemente reduz a densidade populacional de *Ae. aegypti*. Sua utilização é bastante disseminada no Brasil, mas é uma atividade extremamente intensa, dependente da disposição e habilidade dos agentes de saúde, da colaboração da população e de campanhas educativas, como exemplo, “10 minutos contra o *Aedes*” idealizada com base no conhecimento científico dos pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz (Fundação Oswaldo Cruz). É um tipo de controle de difícil sucesso no longo prazo devido ao alto custo para manter a supressão dos

criadouros. Criadouros são os recipientes artificiais e naturais que podem servir como depósitos de água podendo conter ovos, larvas ou pupas. Dentre estes, podemos citar ralos domésticos, vasos de planta, pneus, caixas d'água etc. O *Ae. aegypti* tem preferência em ovipor nestes tipos de criadouros (Cunha *et al.* 2002), mas se não os encontrar, as fêmeas são capazes de ovipor em criadouros naturais (por exemplo plantas do tipo bromélias), embora em baixa frequência (Mocellin *et al.* 2009). Sendo assim, a fêmea do *Ae. aegypti* tem hábito oportunista, pois na ausência de um criadouro produtivo, ainda assim pode realizar a postura em depósitos inesperados ou procurar outro receptáculo em substituição ao de sua preferência (Barrera *et al.* 2008, Maciel-de-Freitas *et al.* 2010). Acredita-se que as fêmeas de *Ae. aegypti* podem apresentar esse comportamento para evitar competição entre suas larvas (Mocellin *et al.* 2009).

As atividades de controle são direcionadas após avaliação de quais e quantos são os criadouros e para isso alguns índices de infestação normalmente são utilizados, embora sejam às vezes insuficientes para estimar a real infestação. Vale ressaltar que somente o número de pupas tem boa correlação com a densidade de adultos (Honório *et al.* 2006), pois as larvas têm alta mortalidade e, dessa maneira, um número inferior ao visto no momento da inspeção dos criadouros alcançará a fase adulta. Índices para analisar o número de pessoas por hectare foram criados para se ter uma maior confiança (Focks e Chadee 1997), e a partir daí infere-se a quantidade de adultos em uma determinada área.

As ovitrampas são armadilhas para capturas de ovos que também fornecem dados de distribuição espacial e presença do *Ae. aegypti* (Honório *et al.* 2003) e são um método econômico e operacionalmente fácil (Regis *et al.* 2008). Mesmo sendo utilizadas para determinar nível de infestação nos locais com baixa densidade do vetor, elas não são ideais para o monitoramento em locais com densidade alta porque estas armadilhas podem conter ovos de diversas fêmeas em poucos dias (Honório 2009). Como o número de adultos está mais correlacionado a infestação local, alguns diferentes tipos de armadilhas foram desenvolvidas. As Adultraps são armadilhas desenvolvidas para a captura de fêmeas grávidas que buscam local para oviposição. Ao entrarem na armadilha que contém água em seu fundo para atrair as fêmeas para oviposição, elas ficam presas nesta câmara interna e não conseguem alcançar este local e também não conseguem sair novamente (Maciel-de-Freitas *et al.* 2008). A MosquiTrap, também desenvolvida para coleta de fêmeas grávidas, é um recipiente preto também com água no fundo (podendo ter um atraente sintético) e um cartão colante no seu interior para prender as fêmeas que entrarem e

pousarem para fazer a postura de seus ovos, esta última com uma taxa de captura maior em relação a Adultrap. (Maciel-de-Freitas *et al.* 2008). A BG-Sentinel Traps foi vista por Maciel-de-Freitas e colaboradores (2006) como sendo uma armadilha que captura mais fêmeas que estão em busca de alimentação sanguínea. Seu funcionamento necessita de bateria ou energia elétrica para que o ventilador que é localizado ao fundo da armadilha promova o movimento de sucção; sendo assim, mosquitos que passam em sua parte superior são sugados e ficam retidos em um saco que se localiza acima deste ventilador. Nesta armadilha também é possível acrescentar um atraente que simula os odores da pele humana.

Pode-se dizer que um criadouro produtivo é aquele recipiente que, além de conter água, também possua quantidade desproporcional de imaturos (larvas ou pupas) em relação aos outros criadouros em uma localidade. A classificação de um recipiente como criadouro chave ocorre quando nele for coletado uma grande proporção de pupas frente ao observado em toda a área de estudo. Em uma tentativa de melhorar o custo-benefício do controle mecânico, foram avaliados os efeitos de focar as atividades de controle no tipo de criadouro mais produtivo ou, indiscriminadamente, em todos os tipos encontrados na área. Foi observado que eliminar somente os criadouros mais produtivos pode ter o mesmo efeito que eliminar todos os tipos. Além disso, a primeira opção pode ser realizada num período muito menor e utilizando um quantitativo menor de agentes de saúde. Por ser menos laborioso, acredita-se que atuar na eliminação somente do criadouro mais produtivo pode ser uma forma válida de diminuir a infestação em áreas endêmicas (Tun-Lin *et al.* 2009).

Para complementar o controle físico, deve-se evitar o contato entre o homem e o vetor com a utilização de telas em janelas e portas, mosquiteiros e repelentes se mostra válido (Ministério da Saúde Brasil 2014).

1.3.2 Controle químico

O inseticida é uma das ferramentas mais usadas no controle de vetores (Rose 2001). Alguns desses compostos podem atuar no sistema nervoso central, causando a morte do inseto. Contudo, seu uso excessivo aumenta a pressão seletiva e favorece a disseminação de alelos de resistência em populações naturais, fato este que pode comprometer e até inviabilizar seu uso efetivo em campanhas de controle subsequentes (Donalísio e Glasser 2002). Com o aumento da frequência dos alelos de resistência em um ambiente sob constante aplicação de inseticidas, nas próximas gerações, as fêmeas resistentes apresentariam uma sobrevivência mais elevada

que as susceptíveis. Assim, a frequência alélica dos genes de resistência aumentaria cada vez mais, reduzindo a eficácia desta ferramenta a médio/longo prazo (Rousch e McKenzie 1987).

Existem quatro classes principais de inseticidas neurotóxicos: organoclorados, carbamatos, organofosforados (OP) e piretróides (PY) (Rozendaal 1997). Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono, hidrogênio e cloro, tendo como um de seus representantes o DDT, desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial. Sabe-se que este composto atua no canal de sódio mantendo-o aberto e impedindo a transmissão normal de impulso nervoso em insetos (Braga e Valle 2007b). Este já foi muito utilizado, mas como se acumula em tecidos animais possui utilização restrita ou até proibida na maior parte do mundo (Chen e Rogan 2003).

Os organofosforados são inseticidas que contêm fósforo, são biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos (Braga e Valle 2007b). Uma de suas desvantagens é a instabilidade química, em especial em relação a variações sazonais de temperatura (Palchick 1996). Um dos principais inseticidas do grupo dos organofosforados é o larvicida temephos, amplamente utilizado por anos em diversos municípios endêmicos para dengue no Brasil. Os organofosforados inibem uma enzima do sistema nervoso chamada Acetilcolinesterase, gerando acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico e com isso o sistema nervoso é estimulado continuamente, resultando na morte do inseto (Braga e Valle 2007b).

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico e assim como os organofosforados inibem a acetilcolinesterase e tem ação letal rápida sobre os insetos (Braga e Valle 2007b). Existem algumas diferenças entre carbamatos e organofosforados: alguns carbamatos são potentes inibidores de Aliesterase (função desconhecida) e apresentam seletividade contra acetilcolinesterase de certas espécies. Outra diferença é que a inibição da acetilcolinesterase nos carbamatos é reversível e nos organofosforados é irreversível (Ware 2000).

Os piretróides são análogos de uma substância do crisântemo, são estáveis, biodegradáveis, não cumulativos em tecidos e poucas vezes causam intoxicação aguda em mamíferos, mas podem causar irritação nas mucosas desses animais (Braga e Valle 2007b). A atuação deles é parecida com a do DDT, mantendo os canais de sódio abertos e estimulando as células nervosas a produzir descargas repetitivas, causando paralisia. A vantagem desse inseticida é que são muito eficazes, agindo com pequenas doses, sendo a desvantagem o alto custo inerente

ao seu processo de produção e a logística de campo (Palchick 1996). Estes são os vendidos comercialmente para serem usados em domicílios.

Apesar de os inseticidas serem muito utilizados, todas essas classes apresentam resistência afetando a reemergência de doenças transmitidas por vetores porque os inseticidas químicos ainda são de grande importância nos programas integrados de controle (Braga e Valle 2007b). A OMS denomina resistência como “uma habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte”, sendo assim, uma parte dos indivíduos podem ter alelos que proporcione a eles resistência a algum produto químico (Braga e Valle 2007b). O inseticida em si não faz essas alterações genéticas nesses indivíduos, porém seu uso indiscriminado aumenta a pressão seletiva e permite a sobrevivência daqueles são resistentes a doses letais (Braga e Valle 2007b).

A resistência aos pesticidas piretróides (PY) foi observada pela primeira vez em 2000, logo após o início de sua aplicação no campo. Entretanto, até 2009, com exceção do estado de São Paulo, o deltametrina era empregada em todo o país em aplicações espaciais e residuais para o controle de *Ae. aegypti*. A detecção da disseminação da resistência ao piretróide em várias localidades resultou em sua substituição pelo malathion (OP). Porém, além do uso doméstico do PY, disponível no varejo, essa classe de inseticidas é utilizada no controle de vetores da doença de Chagas, malária e leishmaniose em diversas regiões brasileiras (Valle *et al.* 2019).

1.3.3 Controle biológico

Neste tipo de controle é introduzido no ambiente animais predadores (peixes ou crustáceos), parasitos ou organismos patogênicos que atuarão diretamente sob a espécie-alvo. Por se um método de controle que não polui o ambiente, visto que deve utilizar espécies nativas, é vantajoso frente aos outros métodos. Por outro lado, para que seja eficiente, é necessário criação em massa da população que vai exercer o controle com posterior distribuição, o que pode comprometer o planejamento operacional em campo (Rozendaal 1997).

A bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), um dos exemplos mais bem sucedidos de controle biológico, mata a larva quando esta a ingere (Rozendaal 1997). A mortalidade ocorre em decorrência desta bactéria liberar cristais que são pró-toxinas com ação inseticida que são ativadas no intestino das larvas, diminuindo o peristaltismo e conseqüentemente a interrupção da alimentação (Braga e Valle

2007b). Com isso o Bti pode ser utilizado em água potável (Chavasse e Yap 1997) e, portanto, torna-se um dos candidatos para substituir o temephos.

1.4 Alternativas de controle

Outras medidas de controle que podemos mencionar são: os inseticidas reguladores de crescimento, uso de mosquitos transgênicos, mosquitos irradiados e o emprego da bactéria *Wolbachia*.

1.4.1 Inseticidas Reguladores de Crescimento

Os reguladores de crescimento de insetos (do inglês: *insect growth regulator* - IGR) podem causar modificações fisiológicas e morfológicas, durante o desenvolvimento e reprodução do inseto. Esse grupo de inseticida, surgido na década de 1970, tem menor toxicidade para mamíferos e tem ação mais específica, pois atuam seletivamente interrompendo o desenvolvimento e o crescimento do vetor ao invés de intoxicação direta.

Um dos grupos de IGR é formado pelos inibidores síntese de quitina, enquanto o outro de compostos relacionados ao hormônio juvenil de insetos, designado como análogos do hormônio juvenil (AHJ) (Slama *et al.* 1974).

O primeiro está diretamente relacionado com a formação da cutícula necessária no desenvolvimento do inseto (Post e Mulder 1974). Existem dois compostos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que são inibidores de quitina, o diflubenzuron e triflumuron (Chavasse e Yap 1997, MS/SVS 2005). Vale ressaltar que populações que são altamente resistentes ao organofosforado temephos são tolerantes a estes dois compostos, podendo ser devido ao alto nível de enzimas detoxificantes (Valle *et al.* 2019).

O segundo interfere com o sistema endócrino do inseto, afetando um conjunto de hormônios que atuam em processos fisiológicos como a ecdise, reprodução, metamorfose e desenvolvimento ovariano (Braga e Valle 2007b). Assim, o desenvolvimento do inseto é afetado retardando ou impedindo a emergência de adultos (Mian e Mulla 1982). Dentre os AHJ, a OMS recomenda os compostos methoprene e pyriproxifen (PPF) (Chavasse e Yap 1997, MS/SVS 2005). O pyriproxifen tem sido utilizado recentemente no Projeto Aedes Estéril (PAE) em parceria com o Ministério da Saúde, Fiocruz de Manaus e Secretaria Municipal de Recife como uma ferramenta de controle do vetor. Essa estratégia consiste em conter em determinadas estações disseminadoras, o larvicida PPF para quando

houver o pouso do mosquito no criadouro, ele adquira em suas pernas e corpo partículas deste inseticida e ao pousar em outros criadouros, estes acabem contaminados e assim os imaturos serão afetados por este inseticida (Moscamed 2020).

Visto que os IGRs não agem da mesma forma que os inseticidas tradicionais, eles se tornaram uma alternativa para a resistência a estes inseticidas. Entretanto, já existem registros também de resistência a esses e está relacionada a Monooxigenases (Braga e Valle 2007b). O ideal é um rodízio desses larvicidas a cada 3 a 4 anos para evitar a pressão seletiva nas populações naturais do vetor (Garcia 2017). Isso reforça a importância de controle racional de vetores visando os diferentes componentes do controle integrado.

1.4.2 Mosquitos Transgênicos

O desenvolvimento da técnica RIDL (do inglês: *Release of Insects containing Dominant Lethal gene*) foi importante para a utilização de mosquitos transgênicos. Essa metodologia consiste na soltura de machos que possuem um gene letal responsável pela morte da prole resultante destes com fêmeas selvagens (Thomas *et al.* 2000). Um gene ativador não é expresso na presença de um inibidor (no caso a tetraciclina), de modo que a linhagem pode ser mantida no laboratório. Na ausência do inibidor, o gene ativador induz a expressão do efetor, levando o inseto à morte em determinada fase da vida.

Assim, a expectativa é de erradicação do mosquito após sucessivas liberações de machos estéreis e mantendo esta prática de maneira continuada para que não ocorra a reintrodução de mosquitos em áreas previamente tratadas. Essa estratégia já foi avaliada nas Ilhas Cayman e na cidade de Juazeiro, no Estado da Bahia (Oliveira 2011).

Em Jacobina (Bahia), a eficácia do programa de liberação começou a cair após cerca de 18 meses. Isso quer dizer que a população suprimida se recuperou quase que a nível inicial de quando foi feita a soltura e, por isso, estes mosquitos transgênicos podem estar em desvantagem seletiva causando sua diminuição após cessar a liberação, embora mais dados sejam necessários para que isto se confirme (Garziera *et al.* 2017, Evans *et al.* 2019).

1.4.3 Mosquitos irradiados

É a técnica de esterilização de insetos irradiação (*sterile insect technique* – SIT). Após serem irradiadas com radiação gama (por 41 segundos), os machos são liberados em campo para acasalar com fêmeas selvagens, o que diminui seu potencial reprodutivo e a população local dos mosquitos (Ferreira *et al.* 2008, Zara *et al.* 2016, Borges 2016). Essa estratégia, apesar de eficiente, possui a mesma desvantagem que a anterior, necessitando de sucessivas liberações em campo.

1.4.4 Bactéria *Wolbachia*

A bactéria *Wolbachia pipientis* Hertig (1936) é um simbiote intracelular transmitido verticalmente da fêmea para a sua prole (Moreira *et al.* 2009). Cerca de 40% dos insetos, de diferentes ordens, estão naturalmente infectados com esta bactéria, dentre coleópteros, dípteros, lepidópteros e outros (Werren *et al.* 2008). Entretanto, até recentemente, essa bactéria nunca havia sido encontrada naturalmente em alguns vetores de doenças como o *Ae. aegypti* e mosquitos do gênero *Anopheles*, transmissores de malária. Após a coleta de *Anopheles gambiae*, em uma vila remota de Burkina Faso, foi observado que estes anofelinos possuíam uma cepa de *Wolbachia* ainda não descrita, a wAnga (Baldini 2014). Apesar de *Wolbachia* já ter sido encontrada naturalmente em uma espécie de *Anopheles*, ainda pode se afirmar que, em geral, este gênero não possui a *Wolbachia*.

A presença de *Wolbachia* na prole de *Ae. aegypti* está associada à presença da bactéria em ao menos um de seus progenitores. Se a fêmea está infectada, todas as larvas nascerão com *Wolbachia*, independentemente de o macho estar ou não com a bactéria. Se macho e fêmea possuírem *Wolbachia*, os filhos terão a bactéria em sua totalidade. Evidentemente, se macho e fêmeas não possuírem a *Wolbachia*, os filhos nascerão isentos desse microrganismo (Walker *et al.* 2011). A bactéria *Wolbachia* é capaz de manipular a biologia reprodutiva do inseto (Min e Benzer 1997). Em *Ae. aegypti* causa um fenômeno conhecido como incompatibilidade citoplasmática (IC), que permeia a dinâmica de transmissão da *Wolbachia*. Se apenas o macho estiver com *Wolbachia*, a fêmea selvagem realizará a postura de ovos inviáveis por haver IC nessa cópula. Neste caso é preciso liberações sucessivas de machos em campo para haver um resultado de supressão da população de mosquitos. Estudos foram realizados previamente utilizando a cepa wMel em mosquitos com background brasileiro, onde se confirmou alta IC e transmissão materna (Dutra 2014).

Observações iniciais mostraram que moscas da espécie *Drosophila melanogaster* (Meigen,1830) apresentavam redução em sua longevidade quando estavam infectadas com *Wolbachia* (Min e Benzer 1997). A cepa wMel foi retirada da mosca *D. melanogaster* e introduzida em ovos *Ae. aegypti*, por isso ela recebe este nome. Entre 2005 foi desenvolvido na Austrália, a inoculação da *Wolbachia* em *Ae. aegypti* por microinjeção. Depois de quatro anos, conseguiu-se efetuar a inoculação por microinjeção e manter uma linhagem estável. A hipótese que justificava a microinjeção era avaliar se a presença da *Wolbachia* seria capaz de reproduzir em *Ae. aegypti* o mesmo fenômeno visto em *D. melanogaster*. Afinal, se a longevidade dos mosquitos fosse diminuída, um número menor de insetos sobreviveria ao período de incubação extrínseco dos arbovírus, reduzindo provavelmente a transmissão. Adicionalmente à redução da longevidade, e até surpreendentemente, a competência vetorial de fêmeas de *Ae. aegypti* a arbovírus foi fortemente influenciada pela presença da *Wolbachia*. Sua aplicação atualmente baseia-se no fato de que mosquitos *Ae. aegypti* com essa bactéria são capazes de bloquear o DENV, ZIKV e CHIKV em comparação com mosquitos livres de *Wolbachia* (Moreira *et al.* 2009, Dutra *et al.* 2016). Assim, espera-se substituir populações nativas de *Ae. aegypti* com elevada susceptibilidade a arbovírus por mosquitos com *Wolbachia*, com reduzida competência vetorial a DENV, ZIKV e CHIKV.

Desta maneira, a bactéria é capaz de invadir rapidamente populações naturais de *Ae. aegypti* (Figura 4), como já demonstrado na Austrália, em cerca de apenas 10 semanas após a soltura. Cerca de 36 meses após a liberação em Cairns, praticamente 100% dos mosquitos das duas áreas piloto ainda se encontrava com *Wolbachia* (Walker *et al.* 2011, Hoffmann *et al.* 2011). Esse dado mostra que a estratégia de substituição é autossustentável, ou seja, não há necessidade de realizar liberações de maneira continuada, após o estabelecimento da população de mosquitos.

Essa estratégia visa diminuir a transmissão dos vírus e não a quantidade de mosquitos. Além disso, trata de um método seguro, não há transferência da bactéria para outras espécies, autossustentável, natural, uma vez que a bactéria está amplamente presente nos insetos e sem fins lucrativos, o que garante a execução de um projeto de pesquisa sem interesses comerciais (Maciel-de-Freitas *et al.* 2012, Popovici 2010).

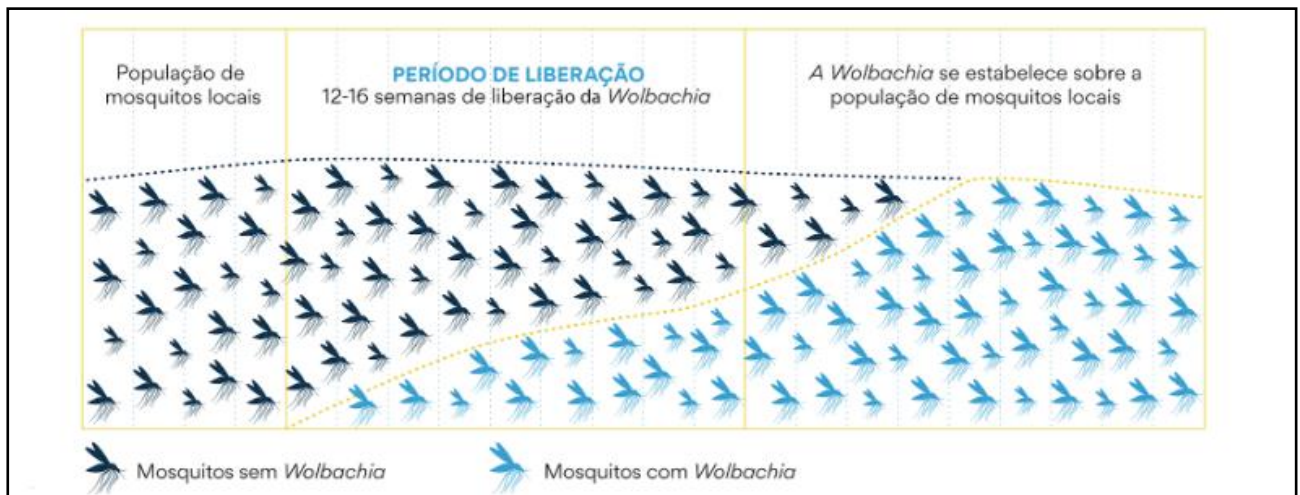


Figura 4: Estabelecimento da bactéria *Wolbachia* em relação a população local de mosquitos por substituição. <https://www.midiamax.com.br/cotidiano/2020/capacitacao-para-implantacao-do-metodo-wolbachia-comecam-nesta-segunda-feira>.

1.5 Vigilância

No final do século XIX foi descoberto que insetos hematófagos poderiam ser responsáveis pela transmissão de agentes infecciosos (Gomes 2002). Este achado foi fundamental para a entomologia quando Patrick Manson fez a descoberta que o mosquito do gênero *Culex* transmitia a *Wuchereria bancrofti* em 1878 (Machado 1987). Com a descoberta a respeito do papel dos mosquitos na transmissão de microorganismos causadores de doenças, foram iniciados os estudos sobre planejamento de medidas que tinham como objetivo a eliminação desses veiculadores de patógenos ou a diminuição de seu contato com o homem (Gomes 2002).

Gomes (2002) define a Vigilância Entomológica como a “contínua observação e avaliação de informações originadas das características biológicas e ecológicas dos vetores, nos níveis das interações com hospedeiros humanos e animais reservatórios, sob a influência de fatores ambientais, que proporcionem o conhecimento para detecção de qualquer mudança no perfil de transmissão das doenças”. Uma peça fundamental na vigilância é garantir, até mesmo em épocas com menor intensidade vetorial, o sistema de registro de dados de forma simples e contínua (Gomes 2002). Uma estratégia utilizada em nosso país para o monitoramento de *Ae. aegypti* é o levantamento de índices de infestação em uma determinada área geográfica. Apesar de nem sempre conseguir determinar a correlação direta entre índices e o risco de transmissão ou epidemia, os índices de

infestação ainda são o mecanismo mais amplamente difundido para gerar estimativa de densidade do vetor (Maciel-de-Freitas 2010).

Dois índices utilizados são: Índice de Infestação Predial (IIP), que mede o percentual de imóveis positivos para as larvas e o Índice de Breteau (IB), que é a razão do número de recipientes positivos para 100 casas pesquisadas (Gomes 2002). Uma desvantagem dos dois métodos é não considerarem a produtividade dos criadouros (número de imaturos em cada depósito) (Gomes 2002). Outra desvantagem é a dependência da habilidade do agente de saúde, uma vez que se baseia na busca ativa por focos. Além disso, a melhor maneira de correlacionar o número de adultos é utilizar a densidade de pupas por hectare ou por pessoa em uma localidade por ter menor mortalidade quando comparadas com a de larvas, podendo também indicar também o risco de transmissão de arbovírus (Honório 2009).

O desenvolvimento de ferramentas para auxiliar a determinação de índices de infestação mais precisos, principalmente para as fêmeas, envolve o uso de armadilhas. No Brasil foram desenvolvidas duas armadilhas para capturar fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* a Mosquitrap e Adultrap que podem ser utilizadas para correlacionar o número da população de adultos coletados em uma localidade com o número de pessoa e, assim, direcionar as atividades de controle para as áreas onde tenha sido capturadas as fêmeas com maior densidade (Honório 2009, Maciel-de-Freitas 2010).

A vigilância virológica deve apoiar a epidemiológica fazendo detecções de sorotipos e variações genéticas circulantes e, junto a isso, a informação de onde uma transmissão está ocorrendo fornece um alerta precoce ou capacidade preditiva de uma transmissão epidêmica; assim, se uma epidemia puder ser prevista, ela poderá ser evitada (Gubler 1998). Entretanto, em condições naturais, a detecção de *Ae. aegypti* infectados com vírus dengue é rara, mesmo em períodos epidêmicos (Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2002, Pessanha *et al.* 2011).

O custo da vigilância entomológica também tem sido alvo de investigações em diversos países. Analisando dados de Vietnam, Indonésia, Peru e República Dominicana, foi observado que o investimento em vigilância corresponde a no máximo 9% dos custos de uma epidemia (Stahl *et al.* 2013). Ainda, foi observada forte associação negativa entre investimento em vigilância e custo epidêmico (Stahl *et al.* 2013). Um estudo de campo com dados coletados em Cairns, Austrália, estimou que uma resposta tardia em 4 ou 6 semanas pode resultar num aumento de 86 (US\$13

milhões) ou 346 vezes (U\$382 milhões) no custo de dengue quando comparado a um cenário de atraso de 2 semanas (Vazquez-Prokopec *et al.* 2010).

Sabe-se que é através dos pacientes sintomáticos para as arboviroses que chegam as unidades de saúde a maneira de identificação de que um vírus está circulando em uma determinada localidade. Mas quando isto acontece, não se consegue mais conter novas transmissões, podendo causar epidemia e assim, fica evidente a necessidade da identificação dos vírus quando eles ainda estão nos mosquitos e não chegaram à população. Porém, com o método molecular que utilizamos atualmente, que é o padrão ouro (PCR), isso não é possível ser feito em todos os mosquitos coletados em campo em todos os municípios devido à falta de verba para pessoal, insumos e equipamentos. Portanto, é necessário um método alternativo e/ou complementar que seja barato, preciso e rápido para identificar arbovírus.

1.6 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS)

1.6.1 Histórico e Teoria

Dentre as propriedades da luz podemos citar o comprimento de onda que é caracterizado pela distância entre 2 máximos, e a frequência que é o número de oscilações da onda por segundo. Sendo assim, quanto maior a onda, menor é a sua frequência e vice-versa, como podemos observar na figura 5 (Poppi e Souza 2019).

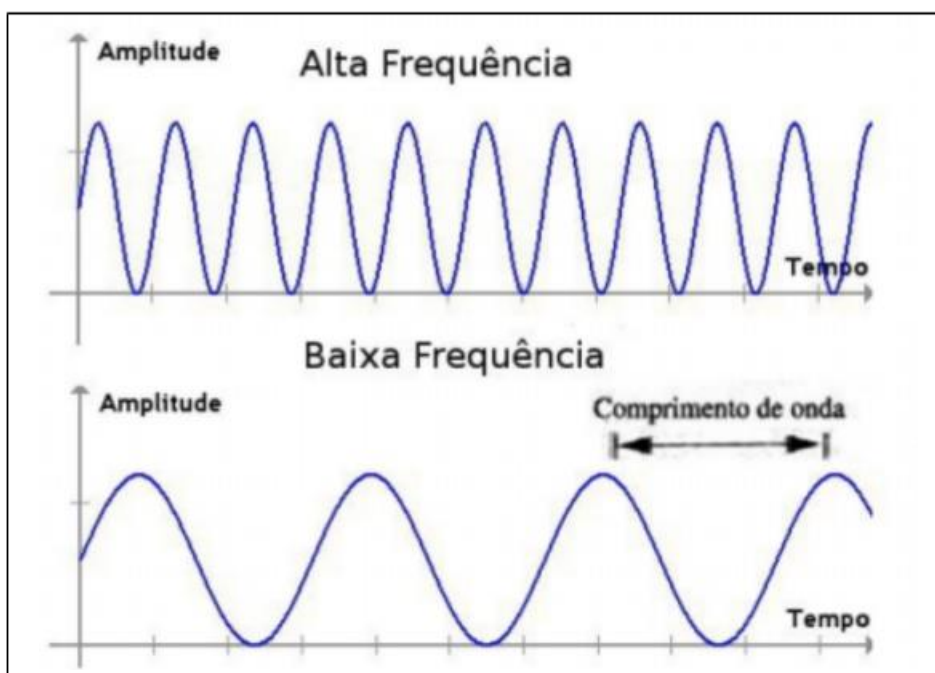


Figura 5: Comprimento de onda e frequência mostrando que quanto menor o comprimento de onda, maior será a frequência e vice versa (Gouveia 2020).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) começa no século 17 com Sir Isaac Newton, ministrando seu primeiro curso na Universidade de Cambridge sobre óptica. Apesar de a refração da luz por um prisma de vidro já ser conhecida, foi Newton o primeiro a estabelecer regras matemáticas através de uma série de experimentos e seu trabalho foi complementado por Frederick William Herschel em 1800 com o descobrimento da luz no infravermelho. Herschel imaginou que poderiam existir outros componentes na luz do sol fora da região visível e, como essa região é invisível para o olho humano, ele criou um experimento para detectá-la. Para isto, ele colocou um termômetro como detector na frente do feixe de radiação infravermelha e observou que a temperatura aumentou além da temperatura ambiente (figura 6), concluindo que a amostra absorvia luz e com isso ele criou o princípio que seria usado no espectrômetro de infravermelho (Baptista e Rio 2013). A espectroscopia é o estudo da interação entre a radiação eletromagnética e a matéria. Ela é a medição da absorção de frequências específicas de luz por moléculas específicas e com objetivo de gerar informações quantitativas e/ou qualitativas (Pasquini 2003).

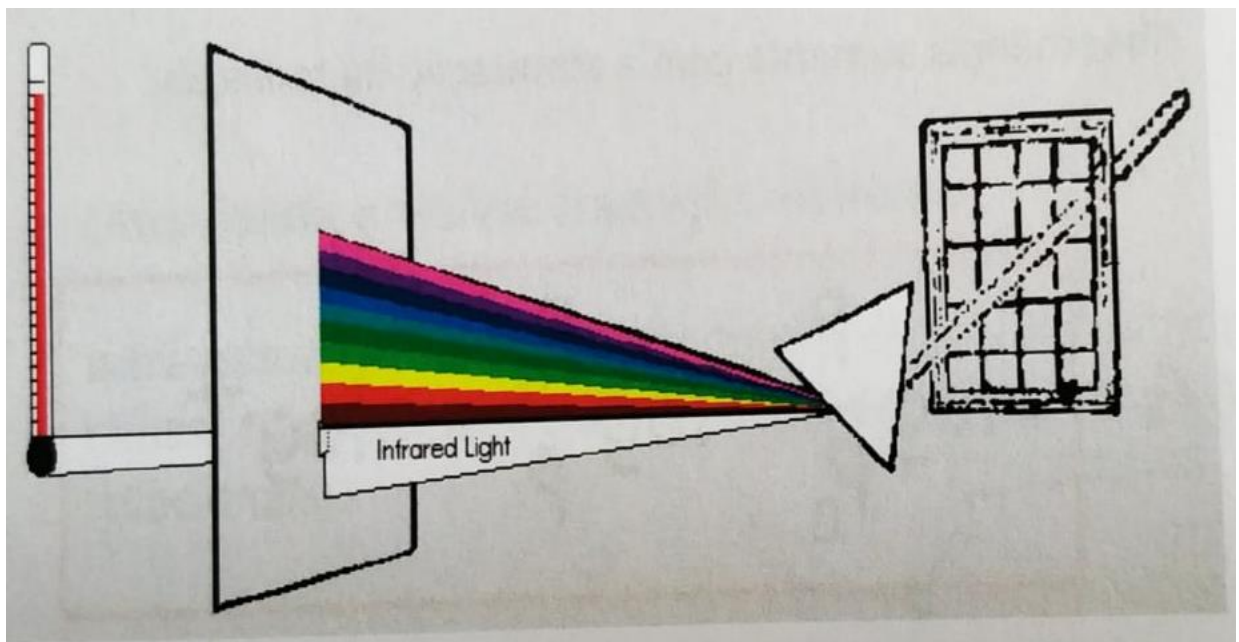


Figura 6: Experimento de Frederic Willian Herschel mostrando o infravermelho seguido da luz visível. Adaptado de Poppi e Souza 2019.

O infravermelho médio (MIR) foi descoberto após o infravermelho próximo e ainda assim, a princípio, foi amplamente utilizado principalmente quando o pesquisador Coblentz começou a realizar seu trabalho. Ele utilizou essa radiação e obteve espectros de substâncias puras e analisou seu uso para identificar grupos funcionais orgânicos, o que foi quase 100 anos após a descoberta do NIR. Então, o NIR estava sendo deixado de lado, pois os espectroscopistas não conseguiram informação atrativa nesta região e MIR estava crescendo tanto teoricamente quanto instrumentalmente (Pasquini 2003). Com o aumento desses números e seu potencial sendo estudado, a espectroscopia NIR foi progredindo e seus instrumentos foram cada vez mais sendo aprimorados, o que levou a melhorias dos dados espectrais e seu tratamento (Kowalski 1980, Pasquini 2003).

A radiação eletromagnética é um tipo de energia que é transmitida através do espaço a grandes velocidades e o Infravermelho próximo (IR) é o nome dado à região do espectro eletromagnético imediatamente superior à região visível em termos de comprimento de onda, ou seja, trata-se da região do infravermelho mais próxima da região visível (figura 7) (Poppi e Souza 2019). A radiação infravermelha pode ser dividida em três regiões do espectro eletromagnético: infravermelho próximo, infravermelho médio e infravermelho distante, sendo a primeira a utilizada nesta tese.

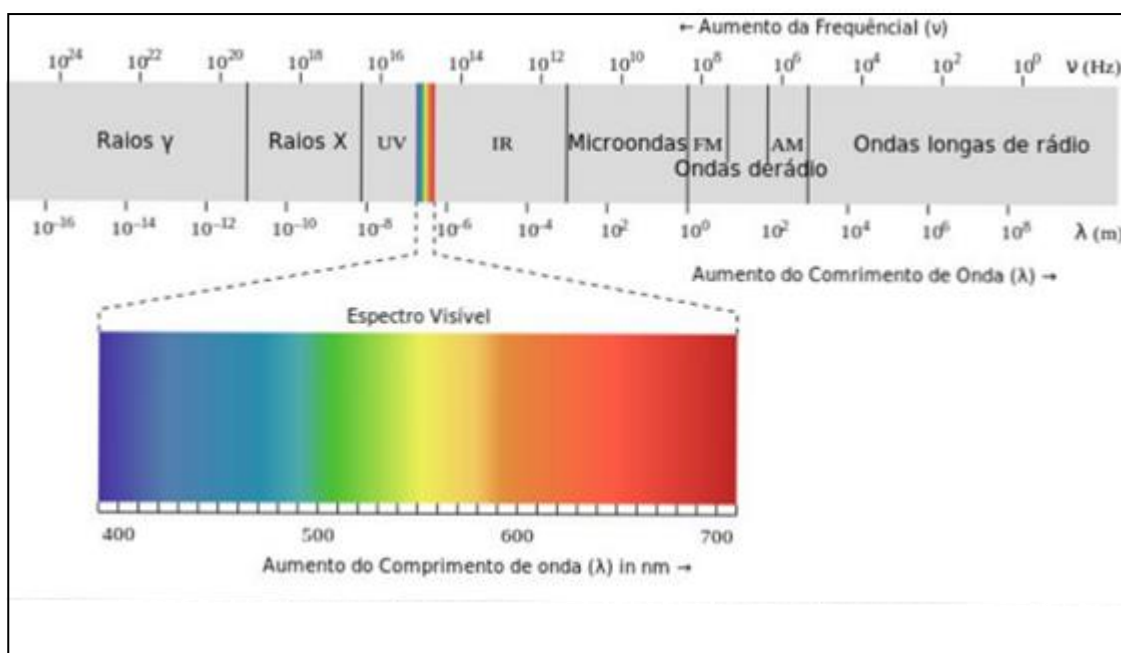


Figura 7: Espectro Eletromagnético mostrando a localização da região do infravermelho. Adaptado Delecape (2011).

O infravermelho é uma radiação que não tem energia suficiente para causar transições eletrônicas como o ultravioleta e visível, mas sim vibracionais, que estão relacionados a átomos ligados e vibrando (Poppi e Souza 2019).

A identificação de uma amostra através de um espectro no infravermelho é semelhante a um jogo de quebra-cabeça, as peças são os modos de vibração das moléculas (estas não vibram aleatoriamente e sim em determinados números de onda), sendo assim, o desafio é identificar os modos de vibração associado a cada pico. Eles podem ser: estirar (simétrico e antissimétrico) ou deformação angular (balançar, abanar, dobrar) (figura 8).

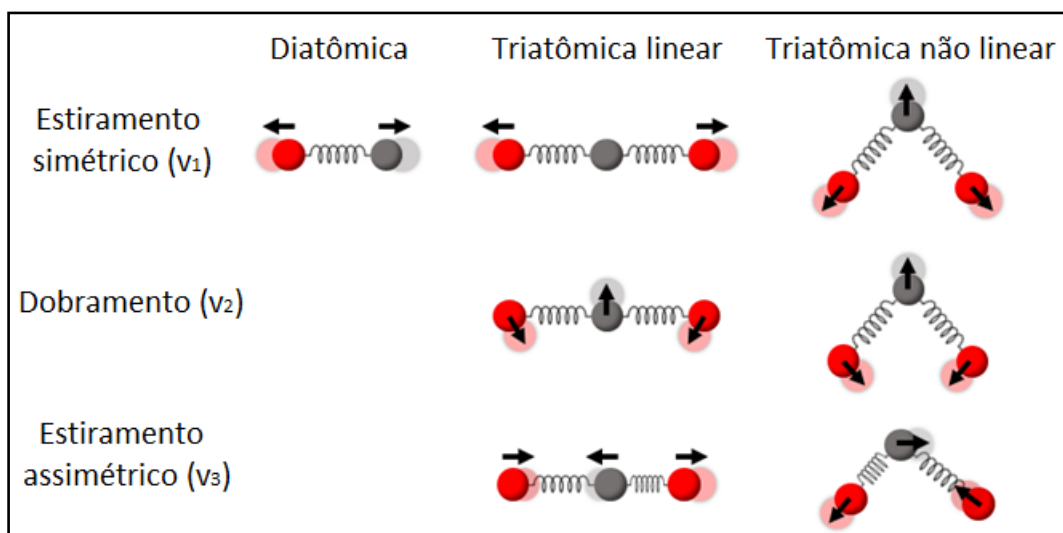


Figura 8: Exemplo de modos vibracionais dos átomos de moléculas podendo ser por estiramento simétrico, estiramento assimétrico ou dobramento. Adaptado Silva 2017.

O espectro de uma amostra é semelhante à nossa impressão digital, ou seja, não existem duas moléculas diferentes com espectros idênticos, ou seja, tem identidade única no universo (Baptista e Rio 2013). A razão das vibrações é de milhares de ciclos por segundo e a frequência dessas vibrações depende da força de ligação química e da massa de cada átomo (Poppi e Souza 2019).

Quando os átomos e grupos de átomos são ligados por diferentes combinações, eles formam moléculas e estas ligações são feitas, em geral, por ligações covalentes. Ao serem irradiadas pela luz, as moléculas absorvem as

frequências de luz que correspondem às frequências da vibração da molécula. A concentração e a composição de moléculas presentes na amostra, por serem variadas, alteram a quantidade de luz absorvida. A absorção fundamental geralmente ocorre na região do infravermelho médio, com sobretons ocorrendo na região do infravermelho próximo, sendo assim, uma banda de estiramento C-H tem uma absorção fundamental em torno de 3400 nm e com sobretons que ocorrem em 1700 nm, 1133 nm, 850 nm e 680 nm.

Na espectroscopia de infravermelho podemos medir essas absorções e traduzi-las em espectros com picos representando as ligações químicas presentes na amostra (figura 9). Assim, essa técnica é não destrutiva, pois preserva o material biológico e de baixo custo, pois não requer aplicação de reagentes. Alterações no espectro de absorção são causadas por diferenças na composição e concentração de moléculas orgânicas presentes na amostra.

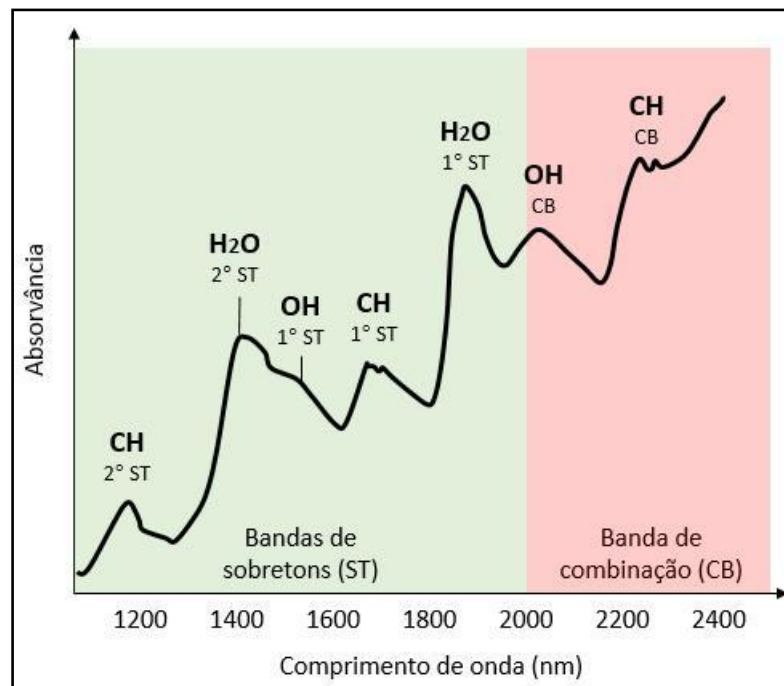


Figura 9: Exemplo de um espectro de absorção NIR de uma amostra orgânica com picos de comprimentos de ondas das moléculas presentes. Adaptado de Silva 2017.

As moléculas constituídas por átomos de peso mais leve (C, N, O, H) vibram a frequências que absorvem luz nas regiões do infravermelho próximo (750-2500nm) (Dowell *et al.* 2017, Pasquini 2018). A vantagem é que isso inclui materiais orgânicos como água, amido, proteína, gordura, óleo, celulose etc o que leva esta técnica a ser muito utilizada para investigações biológicas (Dowell *et al.* 2017).

Thomas Hirschfeld, um espectroscopista reconhecido, contribuiu significativamente para o desenvolvimento de análises NIRS, examinando tanto os aspectos teóricos quanto os instrumentais da nova técnica analítica (Shapiro 1986, Pasquini 2018).

1.6.2 Aplicações

A agricultura foi a primeira área a utilizar esta técnica e também a desenvolvê-la (Pasquini 2003, Burns e Ciurczak 2008). Em 1991 os trabalhos científicos desta área começaram a ser desenvolvidos com metodologias analíticas para determinação de produtos naturais (Nishiyama 1991, Nishiyama 1992, Pasquini 2003). Outra área que utiliza esta tecnologia é a dos polímeros (Pasquini 2003) com trabalhos principalmente sobre seu processamento (Santos *et al.* 1998, Vieira *et al.* 2002) e sobre sua caracterização (Castro *et al.* 2016).

Os trabalhos do setor de petróleo e combustível são desenvolvidos com o objetivo de caracterizar a matriz energética que utiliza o etanol como aditivo ou utiliza o etanol hidratado diretamente como combustível. (Guchardi *et al.* 1998, Pasquini *et al.* 2000). No Brasil, a Agência Brasileira de Petróleo (ANP) e a FINEP (Agência Brasileira de Apoio Financeiro à Pesquisa e Desenvolvimento) incentivam as pesquisas para o desenvolvimento de métodos analíticos em NIRS para substituírem os métodos convencionais pesados e caros para o controle de qualidade de rotina de combustíveis (Pasquini 2003).

A tecnologia também pode ser utilizada na área farmacêutica para monitoramento de processos ou em laboratórios de controle de qualidade (Roggo *et al.* 2007). Já no setor biomédico para, entre outros, análise quantitativa de triglicerídeos no plasma sanguíneo humano (da Costa e Poppi 2001) e para o diagnóstico de infecções por *Toxoplasma gondii* (Duarte *et al.* 2002).

No que diz respeito à entomologia, se pode dizer que os estudos nesse campo da pesquisa se iniciaram cerca de 20 anos atrás. Estudos relacionando a área de entomologia em associação com a agricultura começaram a ser desenvolvidos, como o trabalho de Dowell e colaboradores (1998) em que eles utilizaram o infravermelho para fazerem a identificação de larvas de insetos presentes em grãos de trigo e de arroz e também a diferenciação da espécie que colonizavam. Ainda nesse contexto de associação da entomologia a agricultura, em 1999 o grupo de Dowell fez o teste com 11 espécies de besouros que são

encontradas em grãos armazenados e conseguiu fazer a classificação taxonômica destas espécies com acurácia superior ente 30 a 100%.

No campo de saúde pública, alguns vetores de *Plasmodium* como *Anopheles gambiae sensu stricto* e *An. arabiensis* são espécies idênticas morfológicamente (espécies crípticas) e só podem ser diferenciadas com técnicas moleculares. Assim, a determinação da espécie do vetor e identificação da presença do agente etiológico da malária em vetores também demonstra o funcionamento da técnica (Esperança *et al.* 2018).

Dois anos mais tarde, Sikulu e colaboradores (2011) viram a necessidade de avaliar a aplicação dessa técnica em mosquitos preservados, então testaram o *RNA later* (colocar o nome do fabricante), que é uma solução de estabilização de RNA. Neste trabalho fizeram tanto a identificação daquelas espécies crípticas quanto a classificação etária delas e viram que é possível obter uma boa precisão dessas informações com mosquitos coletados e armazenados após uma semana da coleta.

Com a descoberta na Austrália que após a inoculação da bactéria *Wolbachia* no *Ae. aegypti* ela é capaz de reduzir a transmissão de vírus por este vetor (Moreira *et al.* 2009), surge a ideia de liberar em campo mosquitos contendo esta bactéria, como já foi mencionado. Com isso, utilizar o infravermelho para investigar se este é capaz de fazer a identificação de machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, se estes estão ou não infectados com *Wolbachia* e o tipo de cepa desta bactéria tornam-se estudos relevantes (Sikulu-Lord *et al.* 2016a, Sikulu-Lord *et al.* 2016b).

1.7 Justificativa

As três arboviroses supracitadas têm sua incidência influenciada por fatores bióticos e abióticos que agem sobre um ou mais de seus três elementos: hospedeiro vertebrado (humanos), vetor (mosquito) e agente etiológico (vírus). Após algum debate em relação à transmissão do ZIKV, cresce o consenso de que o mosquito *Aedes aegypti* é o vetor primário dos três arbovírus: DENV, CHIK e ZIKV (Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2004, Vega-Rúa *et al.* 2014, Brito *et al.* 2016). Esse mosquito apresenta elevada capacidade vetorial, visto que está amplamente adaptado ao ambiente urbano, possui alta competência aos arbovírus e tem preferência por picar seres humanos (Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2004, Vega-Rúa *et al.* 2015).

No Brasil, as epidemias causadas pelo vírus dengue geram danos econômicos em cerca de US\$1,35 bi por ano, incluindo custos com insumos (soros,

remédios, exames de sangue), transporte e alimentação de doentes, além da perda de dias produtivos de trabalho (ou no caso de crianças, de escola) (Teich *et al.* 2017, Ecovec 2017). Assim, esse número é ainda maior quando consideramos os vírus Zika e chikungunya.

A vigilância da circulação de arbovírus nos mosquitos se torna essencial para determinar ou ao menos em evitar *clusters* de transmissão, cenário comum quando se analisa a distribuição dos casos no espaço. Contudo, um estudo neste sentido certamente necessitará de detecção viral eficiente, rápida e econômica em um número elevado de insetos coletados em uma extensa área geográfica. Atualmente, a detecção de DENV, CHIK e ZIKV tem sido realizada a partir da técnica RT-PCR (Brito *et al.* 2016, Fernandes *et al.* 2016), enquanto que a presença e quantificação da *Wolbachia* em mosquitos de campo é feita por qPCR (Garcia *et al.* 2016). Ressalta-se que o emprego destas técnicas na rotina se torna muito custosa, consome mais tempo e necessita de profissional capacitado. Logo, sua aplicação em larga escala é inviável.

Recentemente, uma nova técnica vem sendo aplicada para detecção de *Wolbachia* em *Ae. aegypti*. A espectroscopia de infravermelho próximo (do inglês: *Near-infrared spectroscopy* - NIRS) é uma técnica que mede frequências específicas de luz absorvidas pelos grupos funcionais C-H, O-H, S-H e N-H. Os mosquitos são agrupados com base nas diferenças de absorção entre as suas propriedades químicas. A técnica medirá a energia irradiada refletida de uma amostra biológica pela penetração parcial do feixe eletromagnético. Alterações no espectro de absorção são causadas por diferenças na composição e concentração de moléculas orgânicas presentes no mosquito (Sikulu-Lord *et al.* 2016a).

A tecnologia NIRS propõe a medição direta da amostra sem nenhum pré-tratamento, contribuindo para a geração de grandes conjuntos de dados durante a etapa de calibração (Pasquini 2003). Assim poderá ser utilizado em elevado número de insetos coletados em uma extensa área geográfica, o que é inviável de ser executado por RT-qPCR pelo seu custo na aquisição de equipamentos e insumos muitas vezes importados, manutenção de profissional qualificado e tempo necessário. A NIRS é considerada: (a) não destrutiva, pois preserva o material biológico, (b) de baixo custo, pois não requer aplicação de reagentes e (c) rápida, visto que um técnico treinado é capaz de realizar a leitura de uma amostra em apenas 3 segundos.

A NIRS pode permitir um avanço significativo na vigilância virológica ao realizar com grande acurácia a detecção de arbovírus e também a *Wolbachia*

(Sikulu-Lord *et al.* 2016a, Sikulu-Lord *et al.* 2016b) em mosquitos e com isso, podemos utilizar esta informação para determinar a precisa localização de mosquitos e humanos naturalmente infectados e, assim, aumentar consideravelmente a robustez e acurácia de modelos de risco de transmissão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar a performance da Espectroscopia no Infravermelho Próximo em mosquitos *Aedes aegypti* infectados por arbovírus e pela bactéria *Wolbachia*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a acurácia do diagnóstico do vírus Zika em fêmeas de *Aedes aegypti* criados em laboratório.
- Investigar, em laboratório, a capacidade do NIRS de prever o tempo após a morte de fêmeas de *Ae. aegypti* deixadas em uma armadilha BG sentinela por um período de 0-7 dias.
- Apontar a capacidade do NIRS de detectar Zika, CHIKV e *Wolbachia* em mosquitos *Ae. aegypti* deixados nesta mesma armadilha também por 0-7 dias, em laboratório.
- Determinar se o tempo após a morte dos mosquitos afetou a capacidade do NIRS de detectar infecções nos mosquitos *Ae. aegypti*.

3 RESULTADOS

Os resultados desta tese serão apresentados em dois artigos, um publicado e outro submetido.

3.1 Rapid, noninvasive detection of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes by near-infrared spectroscopy.

Artigo publicado na revista Science Advances

3.2 High throughput estimates of *Wolbachia*, Zika and chikungunya infection in *Aedes aegypti* by Near-infrared spectroscopy to improve disease surveillance.

Artigo publicado na revista Communications Biology

EPIDEMIOLOGY

Rapid, noninvasive detection of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes by near-infrared spectroscopy

Jill N. Fernandes,^{1*} Lilha M. B. dos Santos,^{2*} Thaís Chouin-Carneiro,² Márcio G. Pavan,² Gabriela A. Garcia,² Mariana R. David,² John C. Beier,³ Floyd E. Dowell,⁴ Rafael Maciel-de-Freitas,^{2,5} Maggy T. Sikulu-Lord^{1†}

The accelerating global spread of arboviruses, such as Zika virus (ZIKV), highlights the need for more proactive mosquito surveillance. However, a major challenge during arbovirus outbreaks has been the lack of rapid and affordable tests for pathogen detection in mosquitoes. We show for the first time that near-infrared spectroscopy (NIRS) is a rapid, reagent-free, and cost-effective tool that can be used to noninvasively detect ZIKV in heads and thoraces of intact *Aedes aegypti* mosquitoes with prediction accuracies of 94.2 to 99.3% relative to quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). NIRS involves simply shining a beam of light on a mosquito to collect a diagnostic spectrum. We estimated in this study that NIRS is 18 times faster and 110 times cheaper than RT-qPCR. We anticipate that NIRS will be expanded upon for identifying potential arbovirus hotspots to guide the spatial prioritization of vector control.

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne virus of the family *Flaviviridae* transmitted to humans primarily by *Aedes* mosquitoes (1, 2). ZIKV has been of international concern due to its rapid spread in the Americas in 2015–2016 (3) and its association with neurological disorders, such as Guillain-Barré syndrome in adults (4) and microcephaly in infants (5). Timely detection of ZIKV transmission in mosquito populations would be critical for identifying potential hotspots and preventing outbreaks (6). However, adequate mosquito surveillance is missing from most Zika-endemic countries like Brazil, which reported over 1.6 million ZIKV infections between January 2015 and November 2016 (7, 8). Real-time or rapid mapping of arbovirus transmission at the neighborhood or community level could guide the spatial prioritization of vector control (9). To estimate transmission risk, the abundance of mosquito vectors is often used as a proxy for entomological risk and can be determined by trapping adults or using larval measures, such as the Breteau index (10). However, the relationship between vector densities and the prevalence of arbovirus infections in humans is frequently inconsistent across different communities, possibly because vector-human contact also influences infection (11). Viral infection rates among mosquitoes can provide more information about infection risk; however, many arbovirus surveillance programs in low- and middle-income countries do not have the resources to carry out pathogen screening with currently available techniques.

Conventional pathogen screening in mosquito vectors involves time-consuming analysis using molecular techniques, such as quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), which are often too expensive for the analysis of the large numbers of mosquitoes

needed for mosquito surveillance programs (12). For example, when ZIKV was first detected in *A. aegypti* mosquitoes in Brazil, 550 *A. aegypti* were grouped into 198 pools, and only three of the pools were ZIKV positive, or a prevalence of $\leq 0.9\%$ (13). Therefore, routine pathogen surveillance in mosquitoes to identify transmission hotspots would involve testing thousands of mosquitoes each month. The use of honey-baited nucleic acid preservation cards to capture arboviruses from mosquito saliva has been proposed to eliminate the problem of testing individual mosquitoes, but the technique still requires RT-qPCR to test for viral RNA (14). Most of the currently available rapid diagnostic tests (RDTs) for arbovirus detection in mosquitoes rely on the capture of viral antigens through an enzyme-linked immunosorbent assay. A test targeting the dengue nonstructural protein 1 (NS1) has been developed for dengue virus detection in *A. aegypti*. The NS1 test is sensitive and more affordable than RT-qPCR, and it can be coupled with electronic biosensors for point-of-use diagnosis (15–17). However, the specificity of RDTs using antigen detection is a major limitation, given that cross-reactivity of antigen-based assays among flaviviruses has been reported (17). Similarly, a plaque reduction neutralization test can be used to measure virus-specific neutralizing antibodies, but this test shows cross-reaction with antibodies from other flaviviruses (17). Given that RT-qPCR is expensive and time-consuming and there is still uncertainty about the specificity of many antigen-based tests, arbovirus surveillance programs in endemic countries often rely solely on human case reports (7, 18), a strategy which has been inadequate for containing arbovirus outbreaks.

We sought to understand whether near-infrared spectroscopy (NIRS) can be used as an alternative to molecular techniques to detect ZIKV in *A. aegypti* mosquitoes. NIRS is a light-based method of chemical analysis that has been used for decades across fields such as agriculture (19), pharmaceuticals (20), and medicine (21). It classifies biological samples based on the type and the concentration of chemical compounds present in the samples. The technique is easy to use, rapid, and noninvasive, and it does not require reagents to operate (19). Previous applications of NIRS to vector-borne diseases include the age determination of biting midges (22) and house flies (23) and the sex separation of tsetse flies (24). More recently, NIRS has been used on major malaria vectors in Africa to noninvasively and rapidly determine their age and species (25, 26) and to predict the age (27, 28) and the presence of endosymbiont *Wolbachia* (29) in *A. aegypti*. In addition to insect characterization, NIRS has also

Copyright © 2018
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim to
original U.S. Government
Works. Distributed
under a Creative
Commons Attribution
NonCommercial
License 4.0 (CC BY-NC).

¹Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, University of Queensland, St. Lucia, Queensland 4072, Australia. ²Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil. ³Department of Public Health Sciences, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA. ⁴U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Center for Grain and Animal Health Research, 1515 College Avenue, Manhattan, KS 66502, USA. ⁵Department of Public Health Sciences, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA. ⁶Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: maggy.lord@uq.edu.au; maggy.sikulu@gmail.com

been tested in small pilot studies for detecting hepatitis C and human immunodeficiency viruses in human serum and plasma (30, 31) and influenza virus in nasal fluids (32). This study represents the first investigation of the capability of NIRS to noninvasively detect arboviruses in mosquito vectors.

RESULTS

To understand whether NIRS can distinguish ZIKV-infected from uninfected *A. aegypti* mosquitoes, we reared adult females (cohort 1, $n = 275$) to 5 to 6 days of age. We fed half with ZIKV-infected blood and the other half with uninfected blood as a control group. Using a near-infrared (NIR) spectrometer, we collected spectra from the head/thorax region of mosquitoes at 4 and 7 days post infection (dpi) and then confirmed the ZIKV loads by RT-qPCR. We found that analysis of NIR spectra by cross-validation and partial least squares (PLS) regression distinguished ZIKV-infected from uninfected mosquitoes with 92.5% accuracy ($n = 120$). When we applied the ZIKV training model to a subset of samples from cohort 1 that were excluded from the training model ($n = 155$), we found an overall predictive accuracy of 99.3% (Fig. 1). These results suggest that a randomly selected mosquito from cohort 1 could be predicted as infected with ZIKV or uninfected more than 9 out of 10 times based on the spectra of the other mosquitoes in this cohort. The sensitivity appeared to improve with increasing incubation period (Table 1).

To determine whether the ZIKV training model developed from mosquitoes in cohort 1 was robust enough to detect ZIKV infections in a set of independent mosquitoes (that is, unknown to the model), we reared a second cohort (cohort 2, $n = 412$) of female *A. aegypti* mosquitoes and infected half with ZIKV. In addition to determining the overall predictive accuracy of the ZIKV training model, we determined the accuracy of the model on the spectra collected from both heads/thoraces and abdomens and at a longer incubation period. Accordingly, the spectra were collected from the heads/thoraces and abdomens of ZIKV-infected and control mosquitoes in cohorts 2 at 4, 7, and 10 dpi. Using the ZIKV training model developed from cohort 1, we predicted the mosquitoes in cohort 2 as ZIKV-infected or uninfected with an overall predictive

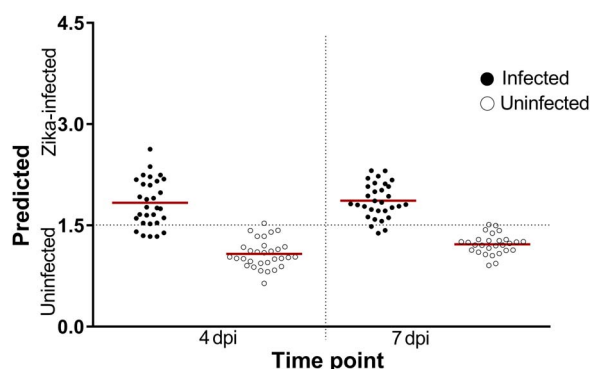


Fig. 1. NIRS differentiation of ZIKV-infected and uninfected *A. aegypti* mosquitoes using leave-one-out cross-validation analysis. Shown are the predictions of the leave-one-out cross-validation analysis carried out on a subset of mosquitoes in cohort 1 ($n = 120$) at 4 and 7 dpi. Each circle represents an individual mosquito; infection status confirmed by RT-qPCR is indicated by solid (infected) or empty (uninfected) circles. Red lines indicate the mean prediction value for each group. The vertical axis indicates infection status as predicted by NIRS, with the dotted line indicating the classification cutoff point. Infected mosquitoes shown below the dotted line and uninfected mosquitoes shown above the dotted line were falsely predicted.

accuracy of 97.3% for heads/thoraces ($n = 412$) and 88.8% ($n = 412$) for abdomens (Fig. 2). Table 1 shows the sensitivity and specificity at various time points for cohort 1 and cohort 2 mosquito samples for heads/thoraces and abdomens as predicted by NIRS.

The highest accuracy (227 of 228 mosquitoes correctly predicted) was obtained when heads/thoraces were scanned at 7 dpi, suggesting that this could be the time point when the effects of ZIKV infection on the chemistry of the mosquito are most pronounced. Although prediction accuracy was lower for 10 dpi than for the first two time points, the sensitivity of this assay was still remarkably high considering that this time point was not accounted for in the training model. The observed higher prediction accuracies of spectra from heads/thoraces compared to spectra from abdomens could be due to the fact that abdomens were not included in the training model. Alternatively, the higher accuracy of head/thorax spectra could suggest that ZIKA infection generates a more marked chemical change in the head/thorax than in the abdomen. Given that the Brazilian strain of ZIKV is only detectable in the heads/thoraces of *A. aegypti* beginning at 4 to 7 dpi (33), there may be an enhanced mosquito immune response to the virus at this time point. Nevertheless, accuracies of 84.8 to 92.6% in the abdomens indicate that the model is still of value for Zika detection in these tissues, particularly when the head/thorax is unavailable for analysis. Together, these results support the external validity of the NIRS-based model for the identification of ZIKV-infected *A. aegypti* mosquitoes.

To further understand the spectral changes influencing the differentiation of ZIKV-infected and uninfected mosquitoes by NIRS, we analyzed the raw spectra (Fig. 3) using PLS regression. There were noticeable differences between the shapes of the average spectra of ZIKV-infected (red) and uninfected mosquitoes (blue), indicating differences in their absorbance characteristics. Important wavelengths identified in the PLS regression coefficients plot (Fig. 4) were observed at 1000, 1413, 1515, 1711, 1801, 1893, 2109, and 2246 nm. Peaks at 1000 and 1801 nm should be considered with caution, as they may be an artifact of the spectrometer used. The spectrometer used in this study contains three sensors: a silicon sensor (350 to 1000 nm) and two InGaAs sensors (1001 to 1800 nm and 1801 to 2500 nm). The transition points between these sensors are 1000 and 1801 nm. However, it is also possible that the peaks at 1000 and 1801 nm truly correspond to molecular components of ZIKV. Further studies using improvements to this instrument or using different equipment are needed to eliminate this source of error. A stronger light source, more efficient fibers, or improved sensors in the current spectrometer could improve the signal-to-noise ratio and minimize or eliminate this noise. The spectral region encompassing peaks at 1413 and 1515 nm is associated with the O–H and N–H overtones (19), which might correspond to glycoproteins in the viral envelope (34) or to antimicrobial peptides produced by the mosquito immune system as part of the Toll pathway (35). Given that NIR spectroscopy has only recently been introduced to the fields of virology (36) and medical entomology (22, 24–27, 29), there is limited information on the NIR bands corresponding to specific physical and chemical changes associated with viral infections in mosquitoes. Future studies should use more informative mid-infrared sensors to elucidate the chemical changes influencing the observed differences.

Here, we calculated that ZIKV detection by NIRS was 18 times faster and 110 times cheaper than RT-qPCR. Given the technique's rapid, high-throughput, and reagent-free nature, hundreds of samples can be processed in a day by unskilled technicians, enabling rapid predictions of potential disease transmission, which in turn could facilitate a rapid action plan to stop major disease outbreaks.

DISCUSSION

The value of NIR spectroscopy as a research tool in vector-borne diseases is only beginning to be realized. In this novel application of

NIR spectroscopy to detect ZIKV in mosquitoes, we found NIR prediction accuracies of 94.2 to 99.3% in differentiating ZIKV-infected and uninfected *A. aegypti* when heads/thoraces are analyzed. Because our aim was to detect ZIKV in vivo, we were unable to distinguish the contributions of the virus itself from those of the mosquito immune response when analyzing the chemical and physical changes associated with changes in the NIR spectra. Future studies of ZIKV in serum and a variety of media using mid-infrared sensors can clarify which chemical compounds are responsible for the differences that we observed between infected and uninfected mosquitoes.

At present, NIR detection of ZIKV is not “field ready,” as the heterogeneity of field-collected mosquitoes must be incorporated into NIR models to achieve robust validity for field applications. Field samples are much more likely to be desiccated and damaged than laboratory mosquitoes, and they represent a variety of ages and feeding statuses. Therefore, the next steps in the development of the technique should include testing it on field populations of *A. aegypti* to determine its sensitivity and specificity for arbovirus detection relative to RT-qPCR. The technique must also be evaluated against different arboviruses in a variety of media to determine the effects of background and to test for any cross-reactivity.

One major drawback of NIRS is the need to purchase a spectrometer with high enough sensitivity to identify the virus. The estimated cost of

Table 1. Sensitivities and specificities of the ZIKV training model.

Predicted sensitivity [true positive rate (TPR)] and specificity (SPC) of NIRS are shown for cohort 1 samples used in the training set at 4 dpi ($n = 61$) and 7 dpi ($n = 59$) and cohort 1 samples that were excluded from the training set (prevalidation) at 4 dpi ($n = 65$) and 7 dpi ($n = 90$). Predicted sensitivity and specificity of NIRS are shown for heads/thoraces of cohort 2 samples at 4 dpi ($n = 136$), 7 dpi ($n = 138$), and 10 dpi ($n = 138$) and for abdomens at 4 dpi ($n = 136$), 7 dpi ($n = 138$), and 10 dpi ($n = 138$).

Experiment set	4 dpi		7 dpi		10 dpi	
	%TPR	%SPC	%TPR	%SPC	%TPR	%SPC
Cohort 1. Training set	83.3	96.8	93.5	96.4	—	—
Cohort 1. Prevalidation set	100.0	94.1	100.0	100.0	—	—
Cohort 2. Test set (heads/thoraces)	98.7	98.3	100.0	98.3	100.0	86.7
Cohort 2. Test set (abdomens)	98.7	85.0	96.2	80.0	97.4	68.3

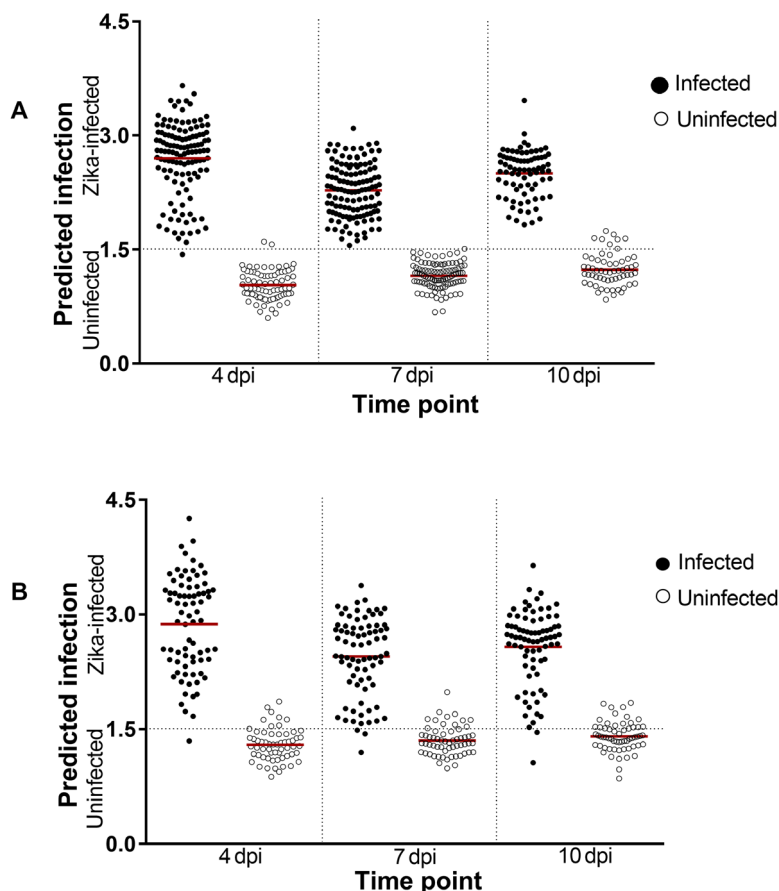


Fig. 2. NIR predictions of ZIKV infection in heads/thoraces and abdomens of *A. aegypti* mosquitoes on a blind data set. (A) Predicted infections at 4, 7, and 10 dpi in heads/thoraces for the subset of cohort 1 ($n = 155$) that were excluded from the model and all cohort 2 samples ($n = 412$). **(B)** Predictions for abdomens from cohort 2 samples ($n = 412$). Each circle represents an individual mosquito; infection status confirmed by RT-qPCR is indicated by solid (infected) or empty (uninfected) circles. Red lines indicate the mean prediction value for each group. The vertical axis indicates infection status as predicted by NIR, with the dotted line indicating the classification cutoff point. Infected mosquitoes shown below the dotted line and uninfected mosquitoes shown above the dotted line were falsely predicted.

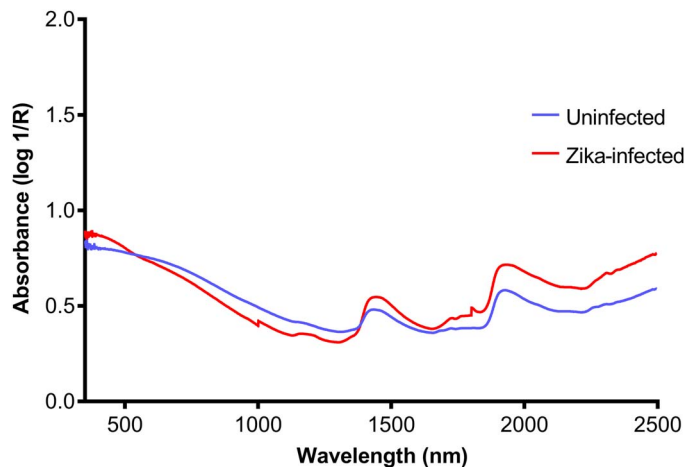


Fig. 3. Average NIR spectra in the 350- to 2500-nm region from heads/thoraces of ZIKV-infected (red) and uninfected (blue) *A. aegypti* mosquitoes.

commercially available benchtop spectrometers that are sensitive enough (defined by a high signal-to-noise ratio) to collect spectra from mosquitoes is \$60,000. Because of the budget restrictions often faced by the public health sector in many disease-endemic countries, it may be necessary to establish NIRS processing centers to scan mosquito samples sent in from entire regions or countries. Because there is no need for reagents, the cost of acquiring such a spectrometer would be recovered after scanning approximately 10,000 mosquitoes. More affordable microspectrometers are commercially available for less than \$500; however, the sensitivity of these spectrometers needs to be tested because of their lower resolution, inherent noise, and more limited range of wavelengths. As the technology evolves and the market for spectrometers grows, the cost and size of spectrometers are expected to decrease significantly. Another major drawback of NIRS is the need to develop a separate data library for each arbovirus or pathogen of interest. However, once a robust data library for ZIKV detection in field mosquitoes is established for a given country, the data library could then be packaged and used by mosquito control programs throughout the country to screen for ZIKV infections in unknown field samples without the need for building new models. If NIRS is as accurate in detecting ZIKV in field mosquitoes as it is in the laboratory, then the speed, cost effectiveness, and non-invasiveness of the technique would make it an attractive technology for the surveillance of mosquito-borne viruses in the future.

Here, we calculated that ZIKV detection by NIRS was 18 times faster and 110 times cheaper than RT-qPCR. However, the user often becomes faster with repeated use of the spectrometer. If used as a pre-screening tool for RT-qPCR or other molecular techniques, NIRS can save time and money by quickly separating infected from uninfected mosquitoes. Because there is no need to dissect or manipulate mosquitoes for NIRS, it is also a safer tool than those assays that require handling potentially infected mosquito tissues. NIRS data can be analyzed by a number of commercially available software packages, as well as free, open-source programs built in R. The data can also be saved in a variety of formats that could be incorporated into decision support systems based on multicriteria system analysis, similar to the system proposed for Ebola control (37). Information on pathogen circulation has been the key element missing from predictive models of arboviruses thus far. Therefore, we believe that rapid arbovirus detection in mosqui-

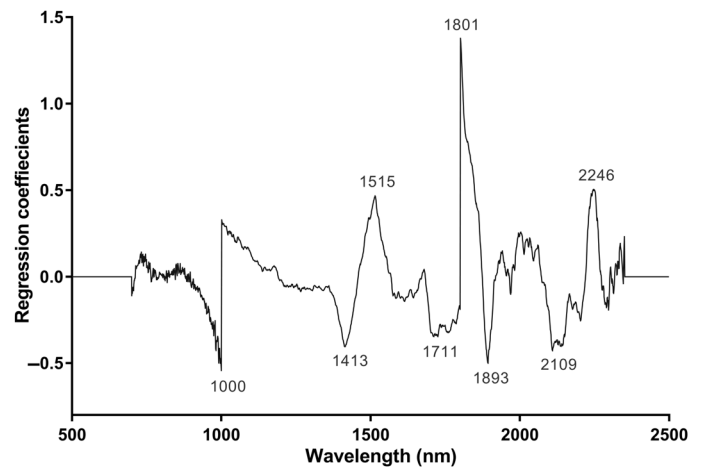


Fig. 4. Regression coefficients using eight factors in the PLS model based on the NIR spectra in the 700- to 2350-nm region for differentiating ZIKV-infected from uninfected *A. aegypti*.

toes by NIRS has the potential to improve the quality and timeliness of surveillance data, thereby accelerating responses to arbovirus outbreaks.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito rearing

All *A. aegypti* mosquitoes were reared in the insectary of the Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Pavilhão Carlos Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, under identical conditions: 27°C, 70% humidity, and 12:12 hours light/dark. Larvae were fed on TetraMin tropical flakes (Tetra Melle) until pupation. Pupae were transferred into cages (40 cm × 40 cm × 30 cm) for emergence. Adults were allowed to mate for 3 to 4 days and were given 10% sugar solution ad libitum up until 36 hours before infection. Two separate cohorts of mosquitoes reared at different time points were used in this experiment: One was used to train the model (cohort 1), and the second was used to test the accuracy of the model (cohort 2).

Experimental ZIKV infection

We used the currently circulating strain of Brazilian ZIKV [BRPE243/2015 (BRPE)] (38), which was isolated from a Zika-infected patient in late 2015 and maintained in cell culture. Viral titers were quantified via plaque-forming assay before experimental infection. In two separate experiments, 1 ml of ZIKV-infected supernatant was harvested from culture, mixed with 2 ml of rabbit blood and 0.5 mM adenosine 5'-triphosphate (as a phagostimulant), and was used to orally infect female *A. aegypti* mosquitoes at 5 to 6 days post-emergence. The viral titer used for mosquitoes in both cohorts was 1.9×10^6 PFU (plaque-forming units)/ml. For each cohort and at each time point, there was a control group of mosquitoes fed with blood and virus-free culture medium.

Scanning of mosquitoes

Mosquitoes from cohort 1 were collected for scanning at 4 and 7 dpi. For cohort 2, mosquitoes were collected for scanning at 4, 7, and 10 dpi. Mosquitoes were killed just before scanning by placing them in a closed jar with an acetate-soaked cotton ball for 1 min. Whole mosquitoes were then arranged on their sides on a Spectralon diffuse reflectance stage for

scanning, as previously described (26). The heads/thoraces of mosquitoes in cohort 1 and the heads/thoraces and abdomens (collecting one spectrum per body part) of mosquitoes in cohort 2 were positioned in the center of the light from a fiber-optic probe. Spectra were collected using a LabSpec 4 *i* NIR spectrometer (Malvern Panalytical) with an internal 18.6-W light source and a 3.2-mm-diameter fiber-optic probe (Model 135325 Rev B, ASD Inc.), according to established protocols (26). The average raw spectra collected from the heads/thoraces of ZIKV-infected and uninfected mosquitoes are shown in Fig. 3.

Confirmation of ZIKV infection by RT-qPCR

Viral RNA was extracted from sampled mosquitoes with a QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen). Viral RNA detection and quantification in each individual were performed through RT-qPCR with the SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) in QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using previously published primers and amplification conditions (13). Virus copy numbers were calculated through absolute quantification in each run using a standard curve of a seven-point dilution series (10^2 to 10^8 copies) of in vitro transcribed ZIKV RNA (39). Virus titers for mosquitoes at each time point are shown in Fig. 5.

Data analysis

We trained and tested the ZIKV detection model according to previously published methods (26). Spectra from 120 ($n = 61$ infected, $n = 59$ uninfected) mosquitoes in cohort 1 were included in the analysis, having excluded the spectra of those samples that failed to amplify ZIKV RNA in RT-qPCR. To minimize noise, only the wavelengths between 700 and 2350 nm were analyzed, and spectra were mean-centered before applying the PLS regression method in GRAMS Plus/IQ software (Thermo Galactic). The number of PLS factors was chosen on the basis of the predicted residual error sum of squares and the regression coefficients plot. In the PLS model, a value of “1” was assigned to the spectra of uninfected mosquitoes, and a value of “2” was assigned to the spectra of ZIKV-infected mosquitoes. A model-predicted value of 1.5 was considered the threshold for correct clas-

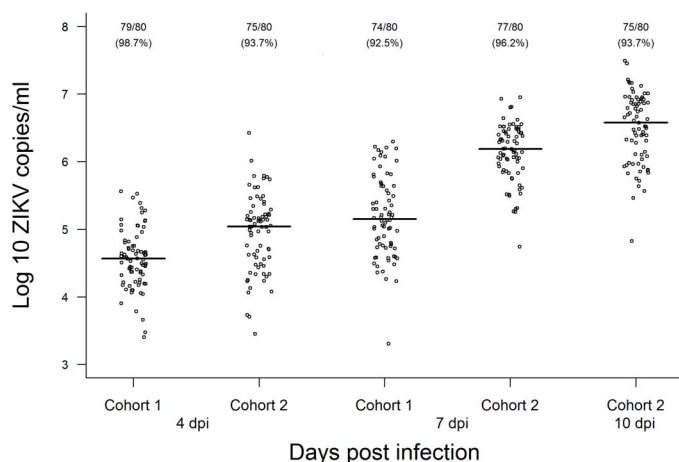


Fig. 5. ZIKV load in *A. aegypti* cohorts at 4, 7, and 10 dpi with a Brazilian ZIKV isolate (BRPE243/2015) provided at a titer of 1.9×10^6 PFU/ml. Viral copies were determined by RT-qPCR in individual mosquito homogenates with a standard curve of a seven-point dilution series (10^2 to 10^8 copies/ml) of in vitro transcribed ZIKV RNA. The number of infected mosquitoes followed by the infection rate (in parentheses) is shown for each condition.

sification. The resulting eight-factor model was then applied to a pre-validation set of mosquitoes from cohort 1 that were not included in the model ($n = 155$ spectra from heads/thoraces) and independent prediction sets ($n = 412$ spectra from heads/thoraces and $n = 412$ spectra from abdomens of mosquitoes in cohort 2, having excluded the spectra of those samples that failed to amplify in RT-qPCR). The accuracy of the model to detect the presence or absence of ZIKV was tested on mosquitoes at 4, 7, and 10 dpi. The regression coefficient plot used to differentiate ZIKV-infected from uninfected female *A. aegypti* is shown in Fig. 4.

Cost and time effectiveness calculation

It took approximately 30 s to position one mosquito on its side on a Spectralon diffuse reflectance stage and to collect a spectrum from its head/thorax using NIRS. Of this time, collecting the spectrum took approximately 15 s. Using NIRS, a total of 50 min was required to scan 100 mosquitoes. Comparatively, it took 2 full days (7.5 hours per day \times 2 days = 900 min) to prepare mosquitoes, extract DNA, and run RT-qPCR to detect ZIKA infection in 100 mosquitoes. This makes NIRS 18 times faster than RT-qPCR (900 min/50 min = 18). We disregarded the delivery time for PCR reagents, which in some countries can be in the order of months.

For cost analysis, we excluded the cost of a NIR spectrometer and a real-time PCR thermal cycler. After the initial purchase of a NIR spectrometer, no reagents were required; therefore, operational running costs for NIRS were only related to labor. For this study, we used a research assistant for \$10 per hour to carry out NIRS experiments for 50 min and scan 100 samples. Comparatively, RT-qPCR costs ~\$10 per sample processed (\$1000 for 100 samples). Labor costs for RT-qPCR were estimated at \$10 per person per hour working for 900 min amounting to \$160 for running RT-qPCR on 100 samples for 2 days. As per our calculations, NIRS in this study was 116 times cheaper than PCR (\$1160/\$10 = 116).

REFERENCES AND NOTES

- D. Musso, D. J. Gubler, Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 487–524 (2016).
- T. Chouin-Carneiro, A. Vega-Rua, M. Vazeille, A. Yebakima, R. Girod, D. Goindin, M. Dupont-Rouzeyrol, R. Lourenço-de-Oliveira, A. B. Failloux, Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004543 (2016).
- World Health Organization, *Mosquito (Vector) Control Emergency Response and Preparedness for Zika Virus* (World Health Organization, 2016).
- E. Oehler, L. Watrin, P. Larre, I. Leparc-Goffart, S. Lastère, F. Valour, L. Baudouin, H. Mallet, D. Musso, F. Ghawche, Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome—Case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* **19**, 20720 (2014).
- M. T. Cordeiro, L. J. Pena, C. A. Brito, L. H. Gil, E. T. Marques, Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet* **387**, 1811–1812 (2016).
- T. Ayllón, R. M. Campos, P. Brasil, F. C. Morone, D. C. P. Câmara, G. L. S. Meira, E. Tannich, K. A. Yamamoto, M. S. Carvalho, R. S. Pedro, J. Schmidt-Chanasit, D. Cadar, D. F. Ferreira, N. A. Honório, Early evidence for Zika virus circulation among *Aedes aegypti* mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1411–1412 (2017).
- W. K. de Oliveira, G. V. A. de França, E. H. Carmo, B. B. Duncan, R. de Souza Kuchenbecker, M. I. Schmidt, Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: A surveillance-based analysis. *Lancet* **390**, 861–870 (2017).
- World Health Organization, *Global Vector Control Response 2017–2030* (World Health Organization, 2017).
- K. M. Pepin, C. B. Leach, C. Marques-Toledo, K. H. Laass, K. S. Paixao, A. D. Luis, D. T. Hayman, N. G. Johnson, M. G. Buhnerkempe, S. Carver, D. A. Gear, K. Tsao, A. E. Eiras, C. T. Webb, Utility of mosquito surveillance data for spatial prioritization of vector control against dengue viruses in three Brazilian cities. *Parasit. Vectors* **8**, 98 (2015).

10. M. Diallo, I. Dia, D. Diallo, C. T. Digne, Y. Ba, S. Yactayo, Perspectives and challenges in entomological risk assessment and vector control of chikungunya. *J. Infect. Dis.* **214**, S459–S465 (2016).
11. N. A. Honório, R. M. Nogueira, C. T. Codeço, M. S. Carvalho, O. G. Cruz, M. A. F. M. Magalhães, J. M. de Araújo, E. S. de Araújo, M. Q. Gomes, L. S. Pinheiro, C. da Silva Pinel, R. Lourenço-de-Oliveira, Spatial evaluation and modeling of dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **3**, e545 (2009).
12. W. Gu, R. J. Novak, Detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**, 636–638 (2004).
13. A. Ferreira-de-Brito, I. P. Ribeiro, R. M. Miranda, R. S. Fernandes, S. S. Campos, K. A. Silva, M. G. Castro, M. C. Bonaldo, P. Brasil, R. Lourenço-de-Oliveira, First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 655–658 (2016).
14. B. J. Johnson, T. Kerlin, S. Hall-Mendelin, A. F. van den Hurk, G. Cortis, S. L. Doggett, C. Toi, K. Fall, J. L. McMahon, M. Townsend, S. A. Ritchie, Development and field evaluation of the sentinel mosquito arbovirus capture kit (SMACK). *Parasit. Vectors* **8**, 509 (2015).
15. D. A. Wasik, A. Mulchandani, M. V. Yates, Point-of-use nanobiosensor for detection of dengue virus NS1 antigen in adult *Aedes aegypti*: A potential tool for improved dengue surveillance. *Anal. Chem.* **90**, 679–684 (2017).
16. G. Sylvestre, M. Gandini, J. M. de Araújo, C. F. Kubelka, R. Lourenço-de-Oliveira, R. Maciel-de-Freitas, Preliminary evaluation on the efficiency of the kit Platelia Dengue NS1 Ag-ELISA to detect dengue virus in dried *Aedes aegypti*: A potential tool to improve dengue surveillance. *Parasit. Vectors* **7**, 155 (2014).
17. H. Aziz, A. Zia, A. Anwer, M. Aziz, S. Fatima, M. Faheem, Zika virus: Global health challenge, threat and current situation. *J. Med. Virol.* **89**, 943–951 (2017).
18. N. L. Achee, F. Gould, T. A. Perkins, R. C. Reiner Jr., A. C. Morrison, S. A. Ritchie, D. J. Gubler, R. Teysou, T. W. Scott, A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003655 (2015).
19. D. A. Burns, E. W. Ciurczak, *Handbook of Near-Infrared Analysis* (CRC press, 2008).
20. Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**, 683–700 (2007).
21. G. Bale, C. E. Elwell, I. Tachtsidis, From Jöbsis to the present day: A review of clinical near-infrared spectroscopy measurements of cerebral cytochrome-c-oxidase. *J. Biomed. Opt.* **21**, 091307 (2016).
22. W. K. Reeves, K. H. S. Peiris, E.-J. Scholte, R. A. Wirtz, F. E. Dowell, Age-grading the biting midge *Culicoides sonorensis* using near-infrared spectroscopy. *Med. Vet. Entomol.* **24**, 32–37 (2010).
23. J. Perez-Mendoza, F. E. Dowell, A. B. Broce, J. E. Throne, R. A. Wirtz, F. Xie, J. A. Fabrick, J. E. Baker, Chronological age-grading of house flies by using near-infrared spectroscopy. *J. Med. Entomol.* **39**, 499–508 (2002).
24. F. Dowell, A. G. Parker, M. Q. Benedict, A. S. Robinson, A. B. Broce, R. A. Wirtz, Sex separation of tsetse fly pupae using near-infrared spectroscopy. *Bull. Entomol. Res.* **95**, 249–257 (2005).
25. M. Sikulu, G. F. Killeen, L. E. Hugo, P. A. Ryan, K. M. Dowell, R. A. Wirtz, S. J. Moore, F. E. Dowell, Near-infrared spectroscopy as a complementary age grading and species identification tool for African malaria vectors. *Parasit. Vectors* **3**, 49 (2010).
26. V. S. Mayagaya, K. Michel, M. Q. Benedict, G. F. Killeen, R. A. Wirtz, H. M. Ferguson, F. E. Dowell, Non-destructive determination of age and species of *Anopheles gambiae* s.l. using near-infrared spectroscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**, 622–630 (2009).
27. M. T. Sikulu-Lord, M. P. Milali, M. Henry, R. A. Wirtz, L. E. Hugo, F. E. Dowell, G. J. Devine, Near-infrared spectroscopy, a rapid method for predicting the age of male and female wild-type and *Wolbachia* infected *Aedes aegypti*. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0005040 (2016).
28. K. Liebman, I. Swamidoss, L. Vizcaino, A. Lenhart, F. Dowell, R. Wirtz, The influence of diet on the use of near-infrared spectroscopy to determine the age of female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **92**, 1070–1075 (2015).
29. M. T. Sikulu-Lord, M. F. Maia, M. P. Milali, M. Henry, G. Mkandawile, E. A. Kho, R. A. Wirtz, L. E. Hugo, F. E. Dowell, G. J. Devine, Rapid and non-destructive detection and identification of two strains of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* by near-infrared spectroscopy. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004759 (2016).
30. J. Saade, M. T. T. Pacheco, M. R. Rodrigues, L. Silveira Jr., Identification of hepatitis C in human blood serum by near-infrared Raman spectroscopy. *Spectroscopy* **22**, 387–395 (2008).
31. A. Sakudo, R. Tsenkova, T. Onozuka, K. Morita, S. Li, J. Warachit, Y. Iwabu, G. Li, T. Onodera, K. Ikuta, A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. *Microbiol. Immunol.* **49**, 695–701 (2005).
32. A. Sakudo, K. Baba, K. Ikuta, Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy. *Clin. Chim. Acta* **414**, 130–134 (2012).
33. A. L. Costa-da-Silva, R. S. Ioshino, H. R. Araújo, B. B. Kojin, P. M. Zanotto, D. B. Oliveira, S. R. Melo, E. L. Durigon, M. L. Capurro, Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. *PLOS ONE* **12**, e0171951 (2017).
34. L. Dai, J. Song, X. Lu, Y. Q. Deng, A. M. Musyoki, H. Cheng, Y. Zhang, Y. Yuan, H. Song, J. Haywood, H. Xiao, J. Yan, Y. Shi, C. F. Qin, J. Qi, G. F. Gao, Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe* **19**, 696–704 (2016).
35. Z. Xi, J. L. Ramirez, G. Dimopoulos, The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLOS Pathog.* **4**, e1000098 (2008).
36. A. Sakudo, Y. Suganuma, T. Kobayashi, T. Onodera, K. Ikuta, Near-infrared spectroscopy: Promising diagnostic tool for viral infections. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 279–284 (2006).
37. C. Phelps, G. Madhavan, R. Rappuoli, R. Colwell, H. Fineberg, Beyond cost-effectiveness: Using systems analysis for infectious disease preparedness. *Vaccine* **35**, A46–A49 (2017).
38. N. R. Faria, R. D. S. D. S. Azevedo, M. U. G. Kraemer, R. Souza, M. S. Cunha, S. C. Hill, J. Thézé, M. B. Bonsall, T. A. Bowden, I. Rissanen, I. M. Rocco, J. S. Nogueira, A. Y. Maeda, F. G. D. S. Vasami, F. L. L. Macedo, A. Suzuki, S. G. Rodrigues, A. C. R. Cruz, B. T. Nunes, D. B. A. Medeiros, D. S. G. Rodrigues, A. L. N. Queiroz, E. V. P. da Silva, D. F. Henriques, E. S. T. da Rosa, C. S. de Oliveira, L. C. Martins, H. B. Vasconcelos, L. M. N. Casseb, D. de Brito Simith, J. P. Messina, L. Abade, J. Lourenço, L. C. J. Alcantara, M. M. de Lima, M. Giovanetti, S. I. Hay, R. S. de Oliveira, P. D. S. Lemos, L. F. de Oliveira, C. P. S. de Lima, S. P. da Silva, J. M. de Vasconcelos, L. Franco, J. F. Cardoso, J. L. D. S. G. Vianez-Júnior, D. Mir, G. Bello, E. Delatorre, K. Khan, M. Creatore, G. E. Coelho, W. K. de Oliveira, R. Tesh, O. G. Pybus, M. R. T. Nunes, P. F. C. Vasconcelos, Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345–349 (2016).
39. M. C. Bonaldo, I. P. Ribeiro, N. S. Lima, A. A. C. Dos Santos, L. S. R. Menezes, S. O. D. da Cruz, I. S. de Mello, N. D. Furtado, E. E. de Moura, L. Damasceno, K. A. da Silva, M. G. de Castro, A. L. Gerber, L. G. P. de Almeida, R. Lourenço-de-Oliveira, A. T. Vasconcelos, P. Brasil, Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004816 (2016).

Acknowledgments: We thank M. C. Bonaldo for providing quantified RNA of ZIKV. In addition, we thank S. Ciocchetta for collecting pilot data before this study. We also thank M. T. Petersen and I. Dias da Silveira for technical support. Lastly, we thank the two reviewers for the feedback on the initial draft of this manuscript. Mention of trade names or commercial products in this publication is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the U.S. Department of Agriculture (USDA). USDA is an equal opportunity provider and employer. **Funding:** This work was supported by the United States Agency for International Development Combating Zika and Future Threats (award no. AID-OAA-F-16-00100), the Brazilian Research Councils MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit E14/2016 (award no. 440929/2016-4), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro E18/2015. Grand Challenges Canada Stars for Global Health funded by the Government of Canada provided funding for pilot data collection (award no. 0781-06). The funders had no role in the study design, data collection, analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The corresponding author had full access to all the data in the study and had the final responsibility for the decision to submit for publication. **Author contributions:** J.N.F., R.M.-d.-F., and M.T.S.-L. conceived the study; J.N.F., L.M.B.d.S., G.A.G., M.R.D., F.E.D., R.M.-d.-F., and M.T.S.-L. designed the experiments; L.M.B.d.S., T.C.-C., G.A.G., and M.R.D. performed the experiments; M.T.S.-L. carried out the analysis; and J.N.F. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from the authors.

Submitted 18 January 2018

Accepted 10 April 2018

Published 23 May 2018

10.1126/sciadv.aat0496

Citation: J. N. Fernandes, L. M. B. dos Santos, T. Chouin-Carneiro, M. G. Pavan, G. A. Garcia, M. R. David, J. C. Beier, F. E. Dowell, R. Maciel-de-Freitas, M. T. Sikulu-Lord, Rapid, noninvasive detection of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes by near-infrared spectroscopy. *Sci. Adv.* **4**, eaat0496 (2018).

Rapid, noninvasive detection of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes by near-infrared spectroscopy

Jill N. Fernandes, Lílha M. B. dos Santos, Thaís Chouin-Carneiro, Márcio G. Pavan, Gabriela A. Garcia, Mariana R. David, John C. Beier, Floyd E. Dowell, Rafael Maciel-de-Freitas and Maggy T. Sikulu-Lord

Sci Adv 4 (5), eaat0496.
DOI: 10.1126/sciadv.aat0496

ARTICLE TOOLS

<http://advances.sciencemag.org/content/4/5/eaat0496>

REFERENCES

This article cites 36 articles, 5 of which you can access for free
<http://advances.sciencemag.org/content/4/5/eaat0496#BIBL>






PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

Science Advances (ISSN 2375-2548) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. 2017 © The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS.

High throughput estimates of *Wolbachia*, Zika and chikungunya infection in *Aedes aegypti* by near-infrared spectroscopy to improve arbovirus surveillance

Lilha M. B. Santos¹, Mathijs Mutsaers ^{1,2}, Gabriela A. Garcia¹, Mariana R. David¹, Márcio G. Pavan ^{1,3}, Martha T. Petersen¹, Jessica Corrêa-Antônio¹, Dinair Couto-Lima¹, Louis Maes ², Floyd Dowell⁴, Anton Lord^{5,6}, Maggy Sikulu-Lord ⁵ & Rafael Maciel-de-Freitas ^{1,3}✉

Deployment of *Wolbachia* to mitigate dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) transmission is ongoing in 12 countries. One way to assess the efficacy of *Wolbachia* releases is to determine invasion rates within the wild population of *Aedes aegypti* following their release. Herein we evaluated the accuracy, sensitivity and specificity of the Near Infrared Spectroscopy (NIRS) in estimating the time post death, ZIKV-, CHIKV-, and *Wolbachia*-infection in trapped dead female *Ae. aegypti* mosquitoes over a period of 7 days. Regardless of the infection type, time post-death of mosquitoes was accurately predicted into four categories (fresh, 1 day old, 2–4 days old and 5–7 days old). Overall accuracies of 93.2, 97 and 90.3% were observed when NIRS was used to detect ZIKV, CHIKV and *Wolbachia* in dead *Ae. aegypti* female mosquitoes indicating NIRS could be potentially applied as a rapid and cost-effective arbovirus surveillance tool. However, field data is required to demonstrate the full capacity of NIRS for detecting these infections under field conditions.

¹Laboratório de Transmissores de Hematozoários, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. ²Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH), University of Antwerp, 2000 Antwerp, Belgium. ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. ⁴USDA-ARS, Center for Grain and Animal Health Research, Manhattan, KS 66502, USA. ⁵The School of Public Health, The University of Queensland, Herston, QLD 4006, Australia. ⁶QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, QLD 4006, Australia. ✉email: freitas@ioc.fiocruz.br

Almost half of the global human population currently live in areas under risk of arbovirus transmission¹. The incidence of mosquito-borne arboviruses, such as dengue (DENV), Zika (ZIKV), and chikungunya (CHIKV) has been on the rise globally in the past decade due to increased geographical spread of the primary vector *Aedes aegypti* and the secondary vector *Aedes albopictus* to places where they were originally absent². Arboviruses outbreaks are linked to favorable climatic conditions, entomological, epidemiological, and immunological factors. The absence of an effective vaccine and a lack of effective and timely vector surveillance system are major contributors of rapid arbovirus spread³, which ultimately pose a high economic burden, including severe disability-adjusted life year to affected populations^{4–6}.

Monitoring the spatial and temporal dynamics of vector populations through larval surveys remains a routine activity in many countries⁷. Although sampling adult mosquitoes provides more reliable estimates of *Aedes* population size and allows stratifying areas according to the risk of outbreaks^{8,9}, estimation of transmission risk rely mostly on monitoring vector density as opposed to virus density in wild mosquitoes. Determining arbovirus infection in wild caught *Aedes* mosquitoes is rarely done by most vector control programs. This is because the positivity rate of captured mosquitoes is in most cases <1% and therefore setting up a large-scale routine surveillance system to detect such a natural infection in trapped mosquitoes is costly, time consuming, and unfeasible in several endemic countries^{10–14}. Nonetheless, predicting when and where the next epidemic will strike is of utmost importance to facilitate vector control intensification in areas where risk is highest. Hence, surveillance methods should be capable of providing rapid detection of arboviruses required to initiate an effective response against arboviral threats¹⁵. In such a scenario, a rapid, accurate, and cost-effective tool will facilitate early arbovirus detection in trapped mosquitoes to trigger early warning systems, which will in turn initiate a timely intervention¹⁶.

One of the most promising ongoing intervention against arboviruses is releasing *A. aegypti* mosquitoes transinfected with the maternally inherited endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis* in the field. This bacterium works by manipulating host reproduction through cytoplasmic incompatibility resulting in nonviable offspring, when uninfected females mate with *Wolbachia*-infected males^{17–19}. *Wolbachia*-infected *A. aegypti* can block transmission of several arboviruses, including DENV^{18,20,21}, ZIKV^{22,23}, CHIKV, Mayaro, and yellow fever virus^{24,25}. The ongoing use of *Wolbachia* in >14 countries is based on replacing the highly susceptible native *A. aegypti* population with the less susceptible *Wolbachia*-infected *A. aegypti* population to ameliorate arboviral transmission^{26–28}. Population replacement is achieved after releasing hundreds of thousands of *Wolbachia*-infected *A. aegypti* mosquitoes. The prevalence of *Wolbachia* in the field is assessed through screening trapped mosquitoes. Such information is intended to guide subsequent releases. For example, whether to increase or reduce the number of insects in future releases or even stop the release if a desired frequency has been achieved. Traditionally, adult mosquito trapping is carried out with BG-Sentinel traps, but ovitraps are sometimes used concomitantly, usually on a weekly basis^{26,27,29}. Collected samples (adult mosquitoes or eggs allowed to hatch in an entomological lab) are often screened with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique to check for the presence of *Wolbachia*, but arboviruses presence in *Wolbachia*-infected and wild *A. aegypti* is rarely assessed²⁷. Traps are inspected once a week in most cases, and thus the majority of trapped mosquitoes have died and dried out for period of time varying between 1 and 7 days²⁷. This presents a big challenge in the detection of arboviruses and bacteria using conventional molecular techniques, such as PCR³⁰.

The near-infrared spectroscopy (NIRS) technique has been demonstrated in a number of entomological studies as rapid, cost-effective, and high-throughput tool for characterizing biological samples based on spectral signatures. The spectral signatures mirror the amount of light reflected back following its absorption by C–H, O–H, S–H, and N–H functional groups present in those samples at specific frequencies. The type and concentration of these chemicals are unique to biological samples, and hence each unique sample can produce a specific diagnostic spectrum that can be analyzed by chemometrics or machine learning techniques to identify them. For this purpose, NIRS is: (a) non invasive, therefore the material can be used multiple times, (b) low cost, as it does not require reagents to operate and (c) rapid, as a spectrum can be collected in just 3 s, therefore allowing hundreds of samples to be analyzed daily. NIRS has been demonstrated for age prediction, species identity and for the detection of the presence of *Plasmodium falciparum* of the major African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* under laboratory, semi-field, and field settings^{31–34}. NIRS has also been used to predict the age of *A. aegypti*³⁵, *A. albopictus*³⁶, and to detect ZIKV in *A. aegypti*³⁷, and *Wolbachia* in *A. aegypti*³⁸ and in fruit flies³⁹.

As a potential next-generation surveillance tool, NIRS could provide a reliable and accurate alternative to age grading, and diagnosis of arboviruses and *Wolbachia* in *A. aegypti*. Furthermore, NIRS could potentially be used to evaluate the spatio-temporal shifts in arbovirus transmission following *Wolbachia* deployment to allow health managers to rapidly and cost effectively assess the impacts of *Wolbachia* in reducing disease transmission and outbreaks. So far, the accuracy of NIRS for age grading and pathogen detection has mainly been demonstrated on fresh or preserved samples^{40,41}. Therefore, the value of NIRS for detecting pathogens in mosquitoes that have been dead in a trap for a period of 7 days is yet to be demonstrated. To develop accurate NIRS models for predicting the presence of viruses and *Wolbachia* in a dead mosquito, ideally the approximate time of death should be known. The main objective of this study was to determine whether NIRS can estimate the approximate death time, and use this information to predict the presence of ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia* in mosquitoes left in a BG-Sentinel trap for a period of 7 days post death.

Results

Confirmation of ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia* in mosquitoes.

Out of the 157, 59, and 163 mosquitoes screened for ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia*, infection was confirmed in 82 (52.3%), 36 (61%), and 163 (100%) of them, respectively. At 7 days post death, 53 (54.6%) of ZIKV-infected mosquitoes were still positive for CHIKV.

NIRS prediction of days post death. The training and testing model consisted of ZIKV ($n = 157$), CHIKV ($n = 59$), *Wolbachia* ($n = 163$), and uninfected mosquitoes ($n = 129$). Monte Carlo simulations were performed using a 75%/25% training/testing split to validate the model. The mean absolute error (MAE; standard deviation) for prediction of days post death in the training group was 1.16 ± 0.88 , 1.24 ± 0.93 , 1.18 ± 0.93 , and 1.15 ± 0.82 for ZIKV, CHIKV, *Wolbachia*, and control mosquitoes, respectively (Fig. 1a). MAE (standard deviation) for days post death in the testing group were 1.25 ± 0.98 , 1.27 ± 0.95 , 1.34 ± 1.71 , and 1.15 ± 0.84 for ZIKV, CHIKV, *Wolbachia*, and control mosquitoes, respectively (Fig. 1b). When considering the accuracy of NIRS for predicting days post death of all mosquitoes regardless of their infection type, they all grouped into four categories (fresh, 1 day old, 2–4 days old and 5–7 days old).

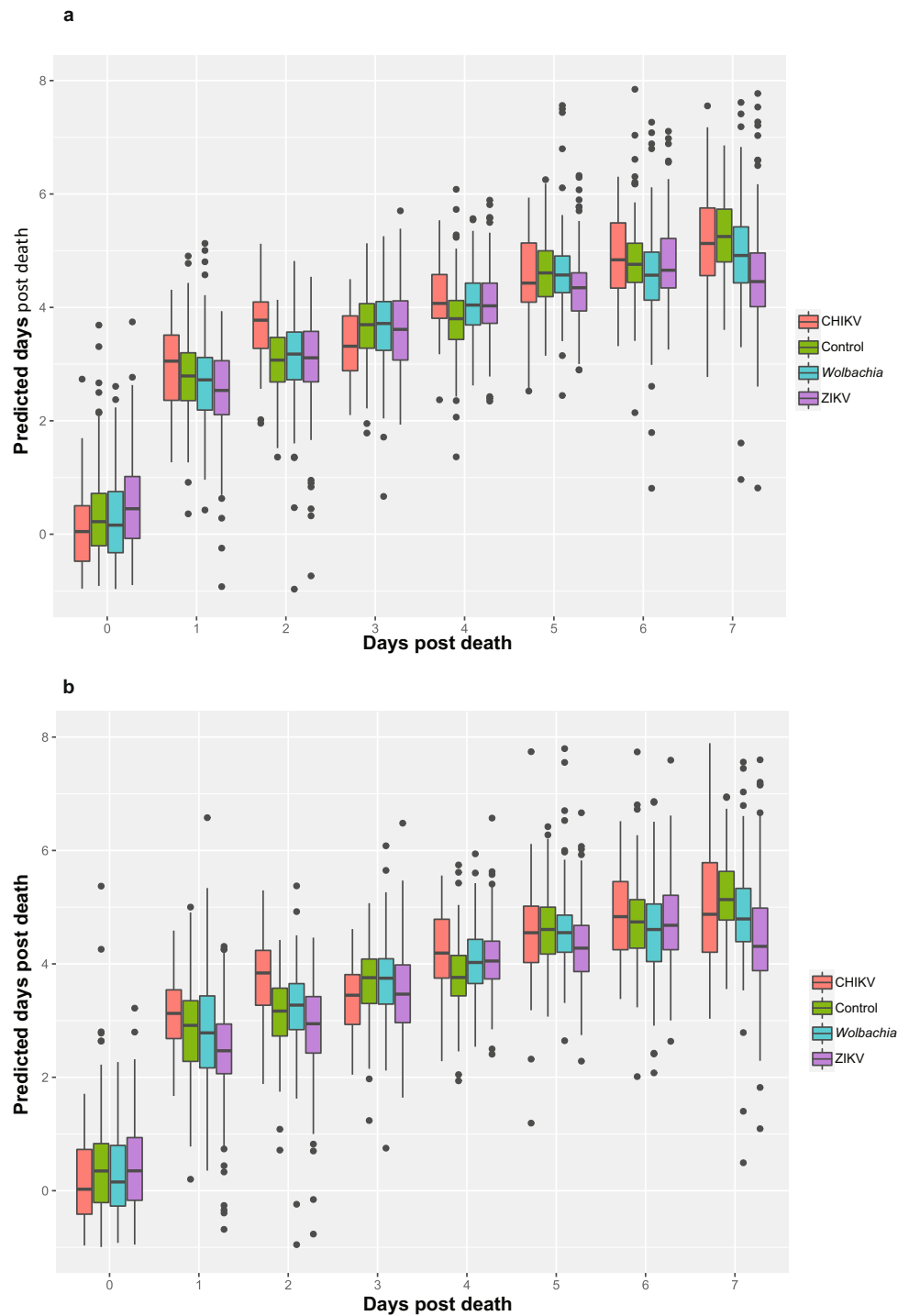


Fig. 1 Death prediction model by days post death and infection status. Results from training data (a) and results from testing data (b). Monte Carlo simulations were performed using a 75%/25% training/testing split to validate the model. Infection status including CHIKV (red), ZIKV (purple), *Wolbachia* (blue), and uninfected controls (green) is presented in both panels. Box and whisker plots follow the standard convention where the box represents the range between quartiles 1 and 3, while the whiskers represent maximum and minimum excluding outliers. Outliers are defined as either $Q1 - 1.5 \times IQR$ or $Q3 + 1.5 \times IQR$.

Predicted scores for each group for all infections followed a similar trend, indicating that infection type does not affect NIRS days post death prediction accuracy (Fig. 2).

NIRS prediction of CHIKV infection. Models for predicting CHIKV were the most accurate, ranging from 95.1% to 99.8% accuracy depending on days post death the mosquitoes were

scanned (Fig. 3a and Table 1). The average accuracy for predicting the presence or absence of CHIKV in mosquitoes regardless of when they died was 97%. Mosquitoes that were scanned on day 1 and day 7 post death were least accurately predicted, whereas mosquitoes that were scanned 5–6 days post death were predicted with a slightly higher accuracy. However, this accuracy did not differ statistically from the accuracy of fresh mosquitoes for all groups ($P = 0.261$). The overall sensitivity of

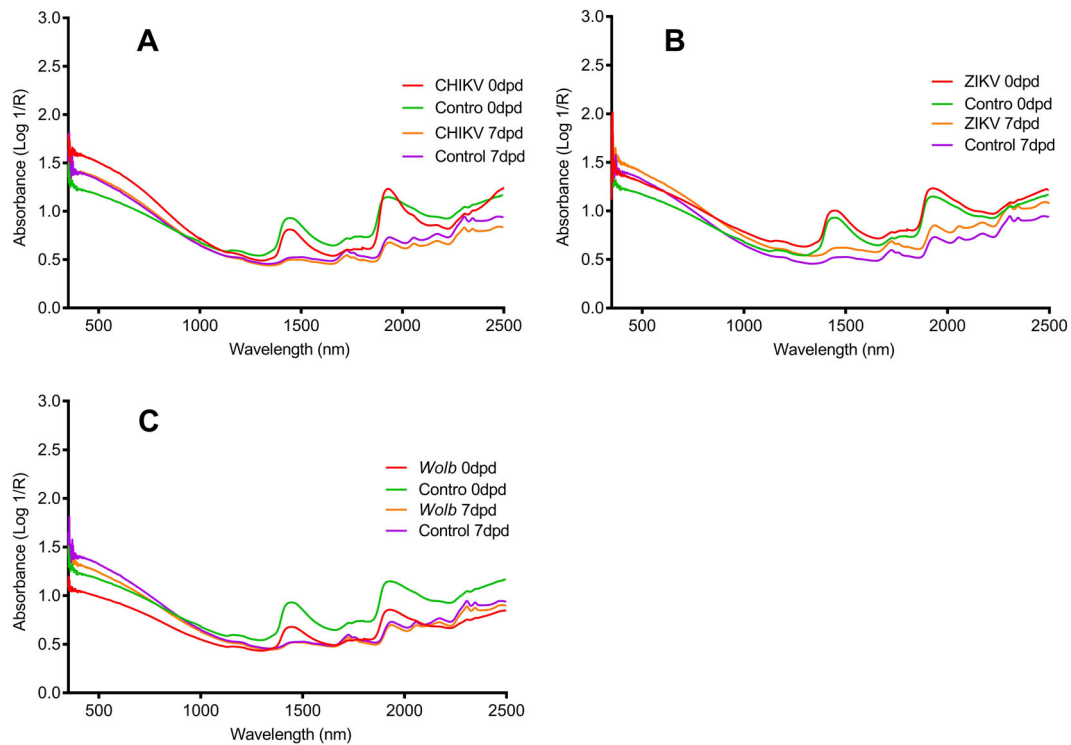


Fig. 2 Changes in raw spectra of *A. aegypti* mosquitoes. CHIKV-infected and uninfected mosquitoes at day 0 and day 7 post death (a), ZIKV-infected and uninfected mosquitoes at day 0 and day 7 post death (b), and *Wolbachia*-infected and uninfected mosquitoes at day 0 and day 7 post death (c).

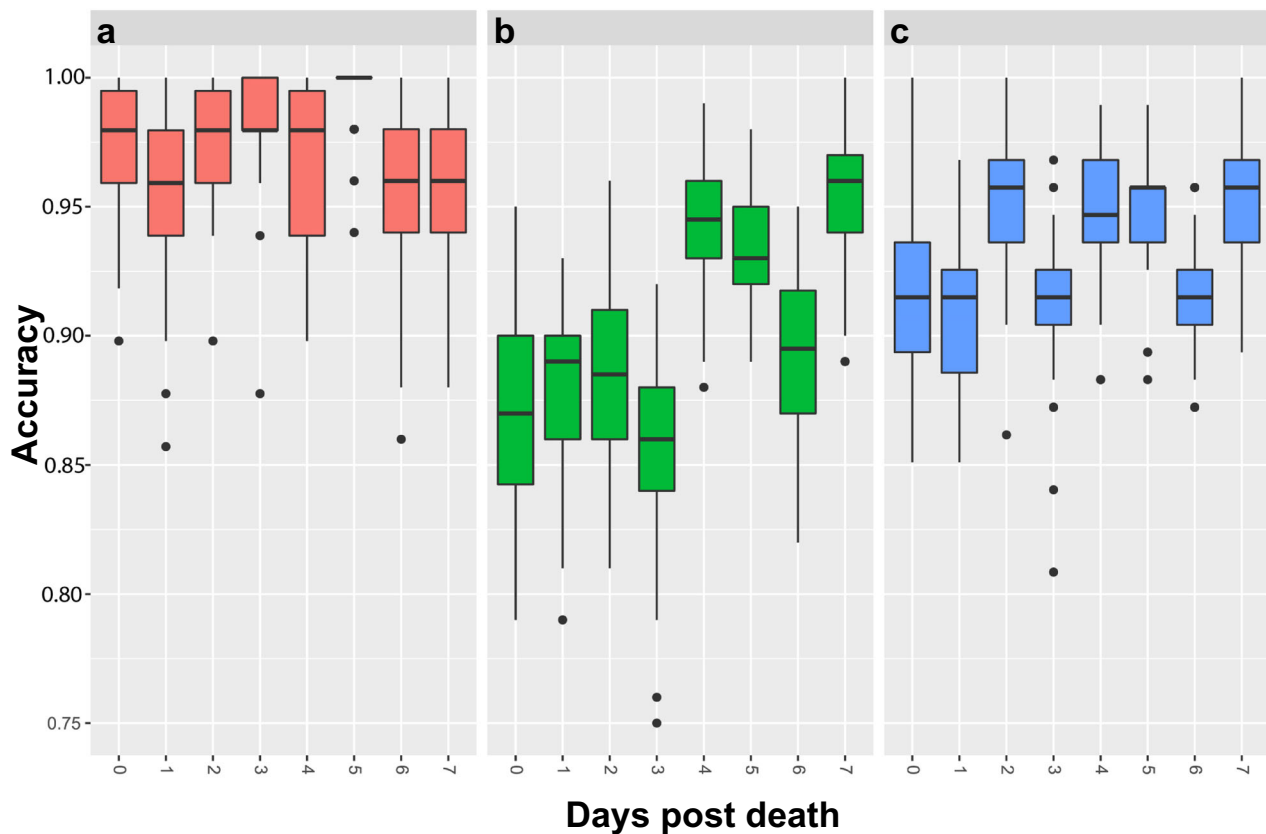


Fig. 3 Prediction accuracy (test set) for detecting infection in *A. aegypti* mosquitoes. Mosquitoes infected with CHIKV (a), *Wolbachia* (b), and ZIKV (c) vs. uninfected mosquitoes. Box and whisker plots follow the standard convention where the box represents the range between quartiles 1 and 3, while the whiskers represent maximum and minimum excluding outliers. Outliers are defined as either $Q1 - 1.5 \cdot IQR$ or $Q3 + 1.5 \cdot IQR$.

Table 1 Accuracy (Acc), sensitivity (Sens), specificity (SPC), and their respective P values of NIRS diagnostic models for ZIKV, CHIKV, and Wolbachia for 0–7 days post death.

Infection Type	Zika				Chikungunya				Wolbachia								
	%Acc	P value	%Sens	P value	%Acc	P value	%Sens	P value	%SPC	P value	%Acc	P value	%Sens	P value	%SPC	P value	
Days post death																	
0	91.8 (2.8)	Ref.	87.7 (5.2)	Ref.	97.3 (2.3)	Ref.	96.7 (4.6)	Ref.	97.7 (2.4)	Ref.	87.1 (3.8)	Ref.	77.7 (6.8)	Ref.	93.0 (2.7)	Ref.	
1	90.7 (3.1)	0.233	83.3 (5.7)	1.000	95.1 (3.2)	0.364	91.6 (6.5)	1.000	96.9 (3.1)	0.647	88.2 (3.4)	0.802	80.0 (5.7)	1.000	93.0 (3.2)	1.000	
2	91.3 (2.8)	0.119	90.4 (4.5)	0.559	97.3 (2.2)	0.270	95.9 (4.4)	1.000	98.0 (2.0)	0.269	88.3 (3.6)	0.797	78.7 (6.2)	0.871	94.6 (3.3)	1.000	
3	91.3 (2.8)	0.233	86.2 (5.2)	0.930	98.5 (2.1)	0.364	99.1 (2.8)	1.000	98.3 (2.3)	0.647	85.8 (3.5)	0.811	72.0 (5.2)	1.000	96.9 (2.5)	1.000	
4	94.7 (2.4)	0.184	90.1 (4.3)	0.610	96.8 (2.7)	0.364	95.5 (5.2)	1.000	97.5 (2.5)	0.647	94.5 (2.5)	0.659	90.4 (5.2)	0.031	96.9 (2.5)	1.000	
5	94.7 (2.4)	0.030	92.0 (4.7)	0.106	99.6 (1.2)	0.261	99.8 (3.4)	1.000	99.8 (0.8)	1.000	93.4 (2.1)	0.776	88.2 (4.7)	0.340	96.4 (2.1)	1.000	
6	91.8 (2.1)	0.077	86.2 (4.0)	0.299	99.6 (3.2)	0.448	96.1 (4.7)	1.000	95.6 (3.8)	0.480	89.3 (3.3)	0.755	79.9 (5.6)	0.186	95.6 (2.8)	0.928	
7	95.0 (2.6)	0.030	91.6 (4.5)	0.106	95.6 (3.0)	0.448	92.1 (6.7)	1.000	97.4 (2.9)	0.480	90.3 (2.5)	0.722	88.9 (5.2)	0.154	99.2 (1.5)	0.226	
Overall	93.2 (3.1)	NA	88.5 (5.6)	NA	97.0 (2.9)	NA	95.8 (5.5)	NA	97.7 (2.8)	NA	90.3 (4.6)	NA	81.9 (8.3)	NA	95.7 (3.3)	NA	

Analysis was run 50 times using Monte Carlo sampling. Numbers represent the mean (standard deviation) of each test. Two sample t tests were performed between the accuracy of correctly predicting infectivity status using fresh (dead) mosquitoes vs. every other day sequentially. P values are not corrected for multiple comparisons.

NIRS for predicting CHIKV in mosquitoes regardless of time of death of a mosquito was 95.8%. This sensitivity ranged from 91.6% to 99.2% depending on the time post death the mosquitoes were scanned, and it was similar to the sensitivity observed for fresh mosquitoes ($P = 1$ in all cases). Similarly, specificity ranged from 95.6% to 99.8% depending on time post death the mosquitoes were scanned, and it did not significantly differ from fresh mosquitoes for all groups ($P = 0.269$; Table 1).

NIRS prediction of Wolbachia infection. The prediction accuracy of NIRS for detecting *Wolbachia* in *A. aegypti* ranged between 85.8% and 95.3% for the testing cohort (Fig. 3b and Table 1) with the average accuracy of 90.3%. The accuracy was not statistically different for all tested groups relative to fresh mosquitoes ($P = 0.722$). Mosquitoes were more accurately predicted (accuracy 95.3%) when scanned 7 days post death. Similarly, sensitivity and specificity values were higher when mosquitoes were scanned 7 days post death. Although not significantly different from fresh mosquitoes, sensitivity and specificity for *Wolbachia* detection increased when mosquitoes were scanned 4 days post death, and the overall sensitivity and specificity regardless of when mosquitoes were scanned was 81.9% and 95.7%, respectively (Fig. 3c and Table 1).

NIRS prediction of ZIKV infection. Regardless of time post death, the average prediction accuracy of NIRS for detecting ZIKV was 93.2% for all mosquitoes scanned for the testing set. This accuracy ranged between 90.7% and 95.1% depending on the time post death mosquitoes were scanned (Fig. 3c and Table 1). The accuracy of predicting mosquitoes 5 and 7 days post death was higher and significantly different from the accuracy obtained when mosquitoes were scanned fresh ($P = 0.03$). The highest paired sensitivity and specificity were 92.0% and 96.5%, respectively, and they were achieved when mosquitoes were scanned 5 days post death. Overall sensitivity and specificity of 88.5% and 96.1% were achieved regardless of when the mosquitoes were scanned (Table 1).

Prediction of infection in fresh vs. mosquitoes that were scanned 7 days post death. When comparing overall accuracy, sensitivity, and specificity of ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia*-infected mosquitoes scanned at 0 days post death (fresh) and those scanned 7 days post death, no difference was observed for CHIKV-infected mosquitoes. However, ZIKV and *Wolbachia*-infected mosquitoes were more accurately predicted 7 days post death than when they were scanned while fresh (Table 1 and Fig. 4).

Discussion

An efficient arbovirus surveillance system monitors the early signs of viral circulation in human population, which would enable a timely response to prevent future disease outbreaks. The development of a rapid and cost-effective tool to identify the presence of arboviruses in mosquitoes is crucial for control of these arboviruses^{16,42,43}, and can minimize disease outbreaks and assist in the timely reinforcement of vector control interventions^{44–47}. Secondly, a tool that can detect infection in mosquitoes that have been left in a trap for an extended period of time, for example, a week, will reduce the time and costs required to retrieve these samples on a daily basis. In this manuscript, we addressed (1) the capacity of NIRS to predict the time post death of female *A. aegypti* mosquitoes left in a BG-Sentinel trap for a period of 0–7 days, (2) the ability of NIRS to detect ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia* in *A. aegypti* mosquitoes left in a BG-Sentinel trap for 0–7 days, and (3) whether time post death of

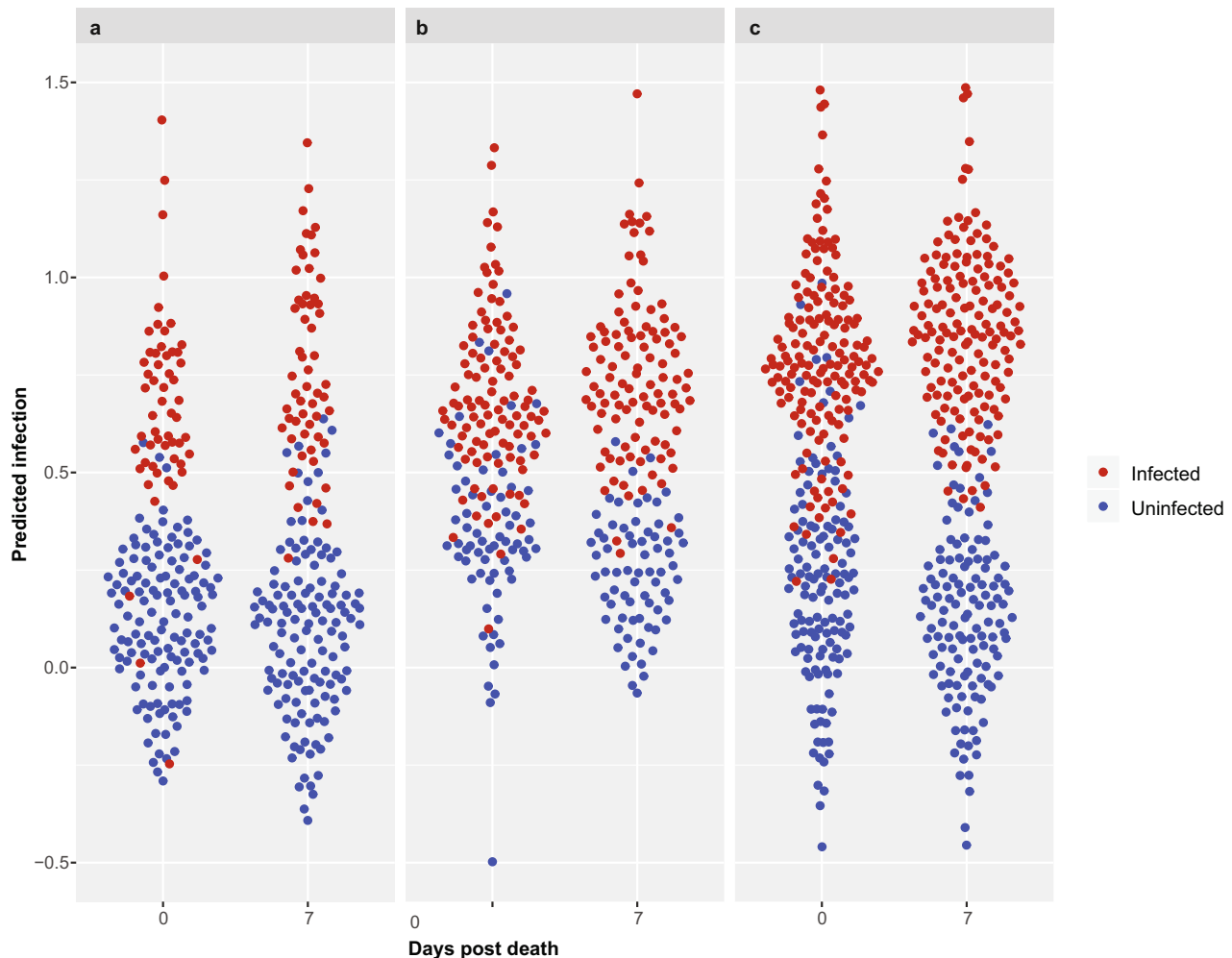


Fig. 4 Prediction scores of uninfected and uninfected mosquitoes for 0 days post death and 7 days post death. Infection scores are shown for CHIKV (a), *Wolbachia* (b), and ZIKV (c), and each dot represents one individual. The Y-axis represents the prediction scores on a continuous scale prior to categorizing into >0.5 (predicted infected) and ≤ 0.5 (predicted uninfected).

mosquitoes affected the capacity of NIRS to detect infections in mosquitoes.

In this study, we obtained 93.2, 97.0, and 90.3% accuracy when NIRS was used to predict ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia* infection in female *A. aegypti* mosquitoes regardless of their time of death. More importantly, NIRS prediction of these infections 7 days post death was not significantly different from fresh mosquitoes. Surprisingly, NIRS showed higher accuracy than RT-qPCR for detecting ZIKV infection in dead mosquitoes. This could be likely due to the degradation of viral RNA at insectary temperature. We hypothesize that the rate of water loss in a mosquito in the presence of an arbovirus might be slower than viral RNA degradation. This allows NIRS to detect these viruses more efficiently than molecular-based approaches, such as the RT-qPCR^{48,49}. NIRS has previously predicted the presence of ZIKV in heads and thoraces of female *A. aegypti* mosquitoes with 97% accuracy³⁷, malaria parasites in *A. gambiae* with 95% accuracy⁵⁰, and the presence of *wMel* and *wMelPop* in female *A. aegypti* mosquitoes with 93% and 96% accuracy, respectively³⁸. Previous studies used either fresh^{37,50} or RNAlater-preserved mosquitoes³⁸ that were reared, infected, and maintained in a temperature-controlled environment and killed with chemicals. Herein, we simulated a more natural setting whereby *A. aegypti* females were killed by shaking the trap, and then left in a BG-Sentinel trap for a period of 0–7 days following their death.

Slightly higher accuracy was observed for CHIKV-infected *A. aegypti* than for ZIKV-infected mosquitoes (Table 1). This difference in accuracy could be attributed to specific viral changes in mosquitoes following an infection^{44,51,52}, initial titers used to infect mosquitoes and the overall chemical composition of a mosquito following an infection. These factors ultimately affect the diagnostic signature and the accuracy. We noted no linear changes on the predicted accuracy or sensitivity for all infections over the 7-day sampling period. For instance, the highest accuracy for ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia* was observed 2, 6, and 7 days post death, respectively. The authors speculate that the rate of water loss following the death of a mosquito could be relative to the type of infection carried by that mosquito because at 7 days post death, all infections were predicted with a relatively higher accuracy compared to fresh mosquitoes possibly indicating the peak of water loss regardless of the infection type. Nonetheless, the $>90\%$ accuracy of NIRS for detecting ZIKV or CHIKV in trapped *A. aegypti* several days post death was impressive, and indicates the potential future application of the tool for this purpose.

The release of *Wolbachia*-infected *A. aegypti* has the potential to become a key component of vector control in the future. In the past decade, *Wolbachia* has been released in small isolated sites and in big cities. Rapid assays to evaluate its effect on a large scale is crucial for assessing its invasion rate^{27,28,53}. Herein, we have

demonstrated the ability of NIRS in detecting *Wolbachia* in female *A. aegypti* up to 7 days post death. Although >85% accuracy was achieved over the 7-day sampling period, the accuracy of NIRS in detecting *Wolbachia* was slightly lower than that for CHIKV- and ZIKV-infected *A. aegypti*. We hypothesize this could be related to the differences between immunological responses against a virus and a bacterium by a mosquito, as well as the distribution of the virus and the bacteria inside the mosquito. The *wMel* strain of the endosymbiont *Wolbachia* is present in higher densities in specific tissues, notably in the ovaries⁵⁴. Spectra of infected and uninfected mosquitoes were collected from the heads and thoraces where the density of *Wolbachia* is still significant, but in lower densities than ovaries to mitigate the effects of abdominal contents on the spectra, which could have had an effect on the accuracy of *Wolbachia*-infected mosquitoes. Future work should investigate whether scanning other parts of the mosquito improves the current accuracy, and whether *Wolbachia* can also be detected in male mosquitoes several days post death of a mosquito.

Monitoring arboviruses circulation in trapped mosquitoes could significantly enhance the knowledge regarding silent transmission of DENV, ZIKV, and CHIKV in endemic settings^{45,55–57}. We define silent transmission as infections that result in either asymptomatic cases or mild symptoms that are undetected by routine surveillance systems⁵⁸. Silent infections hold a significant role in arbovirus transmission because these infections could account for >80% of DENV transmission⁵⁸. Such findings could trigger the deployment of a trap-based surveillance system, whereby rapid detection of pathogens in trapped mosquitoes could inform health managers to conduct cross-sectional serosurveys on nearby households. By doing so, integrated vector management practices, such as social mobilization, empowerment of communities, intensification of vector control, and an assertive case management approaches could locally impact disease transmission.

Mosquitoes used in this experiment were killed by shaking to mimic natural death, i.e., without chemicals. The mosquitoes were added to the catching bag of a BG-Sentinel trap, a harsh microenvironment produced by the constantly blowing fan intended to retain trapped mosquitoes. NIRS predicted the time post death based on the reduction of moisture/water content over time. This can be observed in the spectra shown in Fig. 2, where fresh samples are characterized by broad overtones of water related peaks ~1450 and 1950 nm, and whereby these peaks start to diminish 7 days post death.

The results presented herein are a first step toward the development of a robust arboviruses surveillance system that could be used to predict infections in mosquitoes at different time points. Arboviruses detection under field settings would require additional experiments to account for fluctuating environmental conditions in the field, while mosquitoes are trapped. Furthermore, we acknowledge the fact that a single cohort of mosquitoes was used to develop predictive models for CHIKV. Additional experiments assessing this effect would be essential prior to utilization of NIRS within a field setting. It is expected that current models for ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia* would require to be modified by including field samples in the training model to capture confounding factors, such as diet, microbiome, fluctuating temperature, and humidity prior to field application⁵⁹. Therefore, a direct extrapolation of our results to a field setting must be avoided at this point. Nonetheless, these results are encouraging and will accelerate progress toward developing a rapid and high-throughput arbovirus surveillance system.

Methods

Mosquitoes. Mosquitoes were collected from two sites in Rio de Janeiro, Brazil. To represent the native field population, i.e., those with and without *Wolbachia*.

Wolbachia-free mosquitoes were collected at Urca neighborhood (22° 56' 43" S; 43° 09' 42" W), whereas those infected with *Wolbachia* were collected in Tubiacanga (22° 47' 06" S; 43° 13' 32" W), an isolated village in Rio where *Wolbachia* was first deployed. Infection rates in Tubiacanga are close to 100% (ref. 27). To capture the local genetic diversity for both sites, collection was done using 60 ovitraps homogeneously distributed over the area⁶⁰. Eggs were hatched and larvae reared at the insectarium of the Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, FioCruz. Larvae were fed with TetraMin fish flakes (Tetra GmbH, Melle, Germany) until pupation. Pupae were transferred to cages measuring 40 cm³ and emerging adults received 10% sugar solution ad libitum. Adults were maintained in an insectary under 27 ± 2° C, 70 ± 5% relative humidity and a 12:12 h light:dark cycling period. For the experiment described below, four groups of mosquitoes were used: *Wolbachia*-infected, CHIKV-infected, ZIKV-infected, and wild-type (uninfected) *A. aegypti*.

Experimental blood feeding and infection. F1 female *A. aegypti* that were 5–6 days old were orally fed with 1 ml of ZIKV-infected or CHIKV-infected C6/36 cells supernatant mixed with 2 ml of human blood. We used the currently circulating strain of the Brazilian ZIKV [BRPE243/2015 (BRPE)]⁶¹, which was isolated from a ZIKV-infected patient in late 2015 and maintained in cell culture. The East–Central–South African CHIKV genotype deposited in the GenBank under accession nos. KP164567–KP164572, which was isolated from a patient in 2014 (ref. 62) was used. Viral titers were quantified via plaque forming assay for both ZIKV and CHIKV prior to infection.

The oral infection procedures were performed through a membrane feeding system (Hemotek, Great Harwood, UK) adapted with a pig-gut covering, which gives access to the human blood. The ZIKV viral titer used for mosquitoes was 1.9 × 10⁶ PFU (plaque formation units)/ml and the CHIKV viral titer was 6.3 × 10⁵ PFU/ml. Uninfected and *Wolbachia*-infected mosquitoes were fed similarly with uninfected blood and C6/36 cell culture. At least 40 mosquitoes were used for each experiment type. Mosquitoes were incubated for 7 days to allow the virus to replicate within mosquito body^{51,52} and to allow oviposition to take place. Results presented herein were obtained from three independent experiments for *Wolbachia*, three for ZIKV, and from a single experimental infection for CHIKV. Uninfected mosquitoes were used in every single assay.

Sample preparation and collection of NIRS spectra. Following a 7-day incubation period, mosquitoes were killed by repeated shaking to avoid use of chemicals that could influence spectra characteristics. Mosquitoes were shaken for 5 min, with a 5 min pause to observe recovery, followed by additional 5 min of shaking if needed. Mosquitoes were individually transferred to a grid with 20, 1.5 ml open ended plastic tubes covered with nylon mesh on both ends. The mesh allowed air circulation and simulated the air fan that operates continuously in a BG-Sentinel trap. Mosquitoes in the grid were placed into the catch bag of the BG-Sentinel trap for 7 days. The BG-Sentinel mosquito traps remained side-by-side in the insectary during the experiment, with standard conditions (temperature: 27 ± 2° C; relative humidity: 70 ± 5%; 12:12 h light:dark cycling period).

Spectra collection. Once a day for the 7-day period, mosquitoes remained in the trap. *A. aegypti* females were removed from the plastic grid for scanning with NIRS. By doing so, we were able to determine the limit of detection of NIRS for ZIKV, CHIKV, or *Wolbachia* infection in individually trapped *A. aegypti* mosquitoes. The insects were arranged sideways on a Spectralon diffuse reflection stage, and their heads and thoraces were scanned with a Labspec 4i NIRS spectrometer (Malvern Panalytical, Longmont, CO) using an external 3.2 mm diameter fiber optic probe and a 18, 6 W light source (Model 135325 Rev B, ASD Inc.) according to previously published protocols³¹. Spectra collection was on average 3–5 s per sample.

Confirmation of ZIKV, CHIKV, and *Wolbachia* in mosquitoes. Infected mosquitoes were screened by qPCR to assess their infection status. A subset of 59, 157 CHIKV-infected and ZIKV-infected mosquitoes were assessed using RT-qPCR on legs before they were placed into the BG-Sentinel. A second RT-qPCR was conducted on 97 ZIKV-infected mosquitoes following the 7-day trapping period. Viral RNA was extracted with a QIAamp Mini Viral RNA Kit (Qiagen). Detection and quantification of viral RNA in legs from each individual was performed by RT-qPCR with the SuperScript III Platinum Single-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen), using the QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to published protocols with known primers and amplification conditions^{63,64}. Viral copy numbers were calculated by absolute quantification for each run, using a curve pattern in a six-point dilution series (10¹–10⁶ copies) of in vitro ZIKV and CHIKV RNA transcripts⁶¹. The legs of *Wolbachia*-infected mosquitoes were not screened for *Wolbachia* since *wMel* strain is known to be found in higher densities in *A. aegypti* ovaries and salivary glands compared to their legs²⁰. A subset of 43 mosquito bodies were screened for *Wolbachia* by RT-qPCR after the 7 days in the BG-Sentinel trap. DNA extraction from *A. aegypti* body involved the addition of 50 µl buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.2) and 2 µl proteinase K followed by maceration for 30 s. Samples were incubated at 56° C and then at 98° C for 10 min each. A mixture containing the rps primers for mosquitoes and *wsp* for *Wolbachia* was used in the PCR mixture. Each agarose gel electrophoresis reaction contained a *Wolbachia* positive control

(mosquitoes from a lab colony whose infection has been confirmed by PCR), a PCR-confirmed negative control, and a blank sample (distilled water). Extraction and PCR protocols were performed following published materials^{20,27,29}. The PCR data was used as the gold standard, i.e., a mosquito that received an infected blood meal with a negative PCR result, was considered negative.

Data analysis. Spectral data was analyzed in R version 3.6.2 (Dark and Stormy Night)⁶⁵ using only samples confirmed positive by PCR. Partial least squares (PLS) regression was performed using the package “pls” and summary statistics were generated using the “caret” package. Data were initially encoded as reflectance and was converted to absorbance using Eq. (1).

$$A = \log \frac{1}{R} \quad (1)$$

Equation (1): conversion from reflectance to absorbance. A is the absorbance and R is the reflectance.

Death grading. PLS regression was employed to predict the number of days post death for each sample (0–7 days). A second PLS regression model was developed to predict if samples fit into four categories: (a) freshly killed (day 0), (b) 1 day, (c) 2–4 days, or (d) >4 days post death. These groups were denoted as 0, 1, 2, and 3, respectively. Data were split into training (75%) and testing (25%) groups. The split was performed on a mosquito by mosquito basis, as such data from each mosquito for all days were assigned to either the training or testing set as a group.

The optimal number of factors used was identified computationally by optimizing the accuracy within the training dataset. K -fold cross validation ($k = 5$, reps = 10) was used to simultaneously train the optimal factor level and parameter weights. The model was optimized by minimizing the PLS root mean squared error (RMSE) between actual days post death and predicted days post death. To facilitate interpretation of results, the MAE instead of RMSE is reported for both the training and testing cohorts.

Infectivity prediction. Partial least squares discriminative analysis (PLSDA) was employed for binary classification analyses, including infectivity prediction for ZIKV-infected vs. uninfected, *Wolbachia*-infected vs. uninfected, and CHIKV-infected vs. uninfected. PLSDA was also employed to develop a multi-class classification model simultaneously for ZIKV, *Wolbachia*, CHIKV, and uninfected samples. Data were analyzed individually day by day (i.e., one model for samples on day 0, another for day 1, etc.) and balanced for infectivity status within each cohort independently involving equal number of infected and uninfected samples per cohort. All samples not used to train the model were used to test the model. Infectivity was encoded using one-hot encoding (1 for infected, 0 for uninfected). Optimal factor level identification and parameter weight tuning was performed using the same method, as described for death grading.

One final model was generated to simultaneously differentiate between all conditions present in the study. The process for generating this model is similar to that used to generate the models for differentiating between any one disease and uninfected mosquitoes, however, instead of using one-hot encoding to specify disease as a binary outcome measure, the outcome variable was a multilevel categorical variable (ZIKV, CHIKV, *Wolbachia*, and uninfected). Accuracy instead of RMSE was used to optimize these models.

Accuracy, sensitivity, and specificity for the training and testing sets were reported where prediction scores >0.5 are considered infected and prediction scores <0.5 are considered uninfected.

Monte Carlo simulation. To ensure the robustness of the models, Monte Carlo simulations were employed, and the procedure described above was repeated 50 times, randomly assigning mosquitoes to the training and testing groups differently in each repetition. Results reported describe aggregated results from all runs of the Monte Carlo simulation.

Statistics and reproducibility. Statistical analysis was conducted on R (version 3.6.2—Dark and Stormy Night), using the packages “pls” and “caret” (as described above). The sample sizes for each infection treatment is described above and was based on previous experiments conducted at corresponding author’s laboratory to investigate the presence of ZIKV in freshly infected *A. aegypti*³⁷. Methodology and biological materials are disclosed as much as possible, but if required, further information can be obtained by contacting from the corresponding author. The replicates of infected and control mosquitoes used in a given experimental infection were hatched at different days and raised under the same controlled conditions.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The Source data generated during and/or analyzed during the current study are available as Supplementary Data 1–5. All other data, if any, will be available upon reasonable request.

Received: 10 September 2020; Accepted: 15 December 2020;

Published online: 15 January 2021

References

- Kraemer, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife* **4**, 1–18 (2015).
- Schaffner, F. & Mathis, A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 1271–1280 (2014).
- Yakob, L. & Walker, T. Zika virus outbreak in the Americas: the need for novel mosquito control methods. *Lancet Glob. Health* **4**, e148–e149 (2016).
- LaBeaud, A., Bashir, F. & King, C. H. Measuring the burden of arboviral diseases: the spectrum of morbidity and mortality from four prevalent infections. *Popul. Health Metr.* **9**, 1 (2011).
- Shepard, D. S., Undurraga, E. A. & Halasa, Y. A. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2055 (2013).
- Bartsch, S. M. et al. What is the value of different Zika vaccination strategies to prevent and mitigate Zika Outbreaks? *J. Infect. Dis.* **220**, 920–931 (2019).
- Codeço, C. T. et al. Surveillance of *Aedes aegypti*: comparison of house index with four alternative traps. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003475 (2015).
- Villela, D. A. M., de A Garcia, G. & Maciel-de-Freitas, R. Novel inference models for estimation of abundance, survivorship and recruitment in mosquito populations using mark-release-recapture data. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005682 (2017).
- Villela, D. A. M. et al. A Bayesian hierarchical model for estimation of abundance and spatial density of *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* **10**, e0123794 (2015).
- Juliano, S. A. et al. She’s a femme fatale: low-density larval development produces good disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**, 1070–1077 (2014).
- Pérez-Castro, R. et al. Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 233–240 (2016).
- Dutta, P. et al. First evidence of dengue virus infection in wild caught mosquitoes during an outbreak in Assam, Northeast India. *J. Vector Borne Dis.* **52**, 293–298 (2015).
- Medeiros, A. S. et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance. *PLoS ONE* **13**, e0194108 (2018).
- Ritchie, S. A., Long, S., Smith, G., Pyke, A. & Knox, T. B. Entomological investigations in a focus of dengue transmission in Cairns, Queensland, Australia, by using the sticky ovitraps. *J. Med. Entomol.* **41**, 1–4 (2004).
- Hadler, J. L. et al. Assessment of arbovirus surveillance 13 years after introduction of west Nile virus, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1159–1166 (2015).
- Coelho, F. C. & Codeço, C. T. Precision epidemiology of arboviral diseases. *J. Public Health Emerg.* **3**, 1–1 (2019).
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J. & Hurst, G. D. D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 71–102 (1999).
- Blagrove, M. S. C., Arias-Goeta, C., Failloux, A.-B. & Sinkins, S. P. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 255–260 (2012).
- Ross, P. A., Turelli, M. & Hoffmann, A. A. Evolutionary ecology of *Wolbachia* releases for disease control. *Annu. Rev. Genet.* **53**, 93–116 (2019).
- Walker, T. et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* **476**, 450–453 (2011).
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y. & Xi, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000833 (2010).
- Dutra, H. L. C. et al. *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe* **19**, 771–774 (2016).
- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Velez, I. D. & Osorio, J. E. The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.* **6**, 28792 (2016).
- Aliota, M. T. et al. The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of chikungunya virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004677 (2016).
- van den Hurk, A. F. et al. Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1892 (2012).
- Hoffmann, A. A. et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* **476**, 454–457 (2011).

27. Garcia, G. et al. Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure *Wolbachia* invasion. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007023 (2019).
28. Nguyen, T. H. et al. Field evaluation of the establishment potential of *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasit. Vectors* **8**, 563 (2015).
29. de Jesus, C. P., Dias, F. B. S., Villela, D. M. A. & Maciel-de-Freitas, R. Ovitrap provide a reliable estimate of *Wolbachia* frequency during wMelBr strain deployment in a geographically isolated *Aedes aegypti* Population. *Insects* **11**, 92 (2020).
30. Sylvestre, G. et al. Preliminary evaluation on the efficiency of the kit Platelia Dengue NS1 Ag-ELISA to detect dengue virus in dried *Aedes aegypti*: a potential tool to improve dengue surveillance. *Parasit. Vectors* **7**, 155 (2014).
31. Mayagaya, V. S. et al. Non-destructive determination of age and species of *Anopheles gambiae* s.l. using near-infrared spectroscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**, 622–630 (2009).
32. Milali, M. P. et al. Age grading *An. gambiae* and *An. arabiensis* using near infrared spectra and artificial neural networks. *PLoS ONE* **14**, e0209451 (2019).
33. Sikulu, M. et al. Near-infrared spectroscopy as a complementary age grading and species identification tool for African malaria vectors. *Parasit. Vectors* **3**, 49 (2010).
34. Sikulu, M. T. et al. Using a near-infrared spectrometer to estimate the age of *Anopheles* mosquitoes exposed to pyrethroids. *PLoS ONE* **9**, e90657 (2014).
35. Sikulu-Lord, M. T. et al. Near-infrared spectroscopy, a rapid method for predicting the age of male and female wild-type and *Wolbachia* infected *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–11 (2016).
36. Lambert, B. et al. Monitoring the age of mosquito populations using near-infrared spectroscopy. *Sci. Rep.* **8**, 5274 (2018).
37. Fernandes, J. N. et al. Rapid, noninvasive detection of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes by near-infrared spectroscopy. *Sci. Adv.* **4**, eaat0496 (2018).
38. Sikulu-Lord, M. T. et al. Rapid and non-destructive detection and identification of two strains of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* by near-infrared spectroscopy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004759 (2016).
39. Aw, W. C., Dowell, F. E. & Ballard, J. W. O. Using near-infrared spectroscopy to resolve the species, gender, age, and the presence of *Wolbachia* infection in laboratory-reared *Drosophila*. *G3* **2**, 1057–1065 (2012).
40. Dowell, F. E., Noutcha, A. E. M. & Michel, K. The effect of preservation methods on predicting mosquito age by near infrared spectroscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**, 1093–1096 (2011).
41. Sikulu, M. et al. Evaluating RNAlater® as a preservative for using near-infrared spectroscopy to predict *Anopheles gambiae* age and species. *Malar. J.* **10**, 186 (2011).
42. Taylor, L. H., Latham, S. M. & Woolhouse, M. E. J. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **356**, 983–989 (2001).
43. Ellwanger, J. H., de L Kaminski, V. & Chies, J. A. B. How to detect new viral outbreaks or epidemics? We need to survey the circulation of viruses in humans and other animals using fast, sensible, cheap, and broad-spectrum methodologies. *Braz. J. Infect. Dis.* **21**, 211–212 (2017).
44. Vasconcelos, P. F. C. & Calisher, C. H. Emergence of human arboviral diseases in the Americas, 2000–2016. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **16**, 295–301 (2016).
45. Pettersson, J. H. O. et al. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 1–8 (2018).
46. Liang, G., Gao, X. & Gould, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg. Microbes Infect.* **4**, 1–5 (2015).
47. de Abreu, F. V. S. et al. Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **114**, e190076 (2019).
48. Sakudo, A., Suganuma, Y., Kobayashi, T., Onodera, T. & Ikuta, K. Near-infrared spectroscopy: promising diagnostic tool for viral infections. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 279–284 (2006).
49. Sakudo, A. et al. A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. *Microbiol. Immunol.* **49**, 695–701 (2005).
50. Maia, M. F. et al. Detection of *Plasmodium falciparum* infected *Anopheles gambiae* using near-infrared spectroscopy. *Malar. J.* **18**, 85 (2019).
51. Roundy, C. M. et al. Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for Zika virus transmission. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 625–632 (2017).
52. Dubrulle, M., Mousson, L., Moutailler, S., Vazeille, M. & Failloux, A.-B. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS ONE* **4**, e5895 (2009).
53. O'Neill, S. L. et al. Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses. *Gates Open Res.* **2**, 36 (2018).
54. Dutra, H. L. C. et al. From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003689 (2015).
55. SINGH, J. et al. Silent spread of dengue and dengue haemorrhagic fever to Coimbatore and Erode districts in Tamil Nadu, India, 1998: need for effective surveillance to monitor and control the disease. *Epidemiol. Infect.* **125**, 195–200 (2000).
56. Souza, T. M. L. et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. *Sci. Rep.* **9**, 2760 (2019).
57. Torres, M. C. et al. Re-introduction of dengue virus serotype 2 in the state of Rio de Janeiro after almost a decade of epidemiological silence. *PLoS ONE* **14**, e0225879 (2019).
58. ten Bosch, Q. A. et al. Contributions from the silent majority dominate dengue virus transmission. *PLOS Pathog.* **14**, e1006965 (2018).
59. David, M. R., Dos Santos, L. M. B., Vicente, A. C. P. & Maciel-de-Freitas, R. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 577–587 (2016).
60. Rašić, G. et al. Contrasting genetic structure between mitochondrial and nuclear markers in the dengue fever mosquito from Rio de Janeiro: Implications for vector control. *Evol. Appl.* **8**, 901–915 (2015).
61. Bonaldo, M. C. et al. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004816 (2016).
62. Teixeira, M. G. et al. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 906–907 (2015).
63. Ferreira-de-Brito, A. et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 655–658 (2016).
64. da Silveira, I. D. et al. Zika virus infection produces a reduction on *Aedes aegypti* lifespan but no effects on mosquito fecundity and oviposition success. *Front. Microbiol.* **9**, 3011 (2018).
65. R Development Core Team, R. *Computational Many-Particle Physics. R Foundation for Statistical Computing* 739 (Springer Berlin, Heidelberg, 2008).

Acknowledgements

We would like to thank the technical support of Marcelo Celestino, Renato Carvalho, Marcelo Quintela, and Mauro Muniz for field and lab assistance.

Author contributions

M.S.-L. and R.M.d.F. conceived the study. L.M.B.S., M.M., G.A.G., M.R.D., M.G.P., and D.C.-L. processed the experimental data. L.M.B.S., M.T.P., J.C.A., and D.C.-L. conducted molecular assays and interpretation. M.G.P., D.C.-L., F.D., A.L., and M.S.-L. conducted data analysis. L.M., A.L., M.S.-L., and R.M.d.F. wrote the initial draft of the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01601-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.M.-d.F.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

4 DISCUSSÃO

O valor da técnica de espectroscopia NIR como ferramenta de pesquisa em vetores de doenças está apenas começando a ser realizada. Um dos primeiros passos para uma vigilância eficiente de arbovírus é monitorar os primeiros sinais de circulação viral na população humana, o que permitiria uma resposta a tempo para prevenir surtos de doenças futuras. O desenvolvimento de uma ferramenta rápida e econômica para identificar a presença de arbovírus em mosquitos é crucial para o controle desses arbovírus (Taylor *et al.* 2001, Coelho e Codeço 2019, Ellwanger *et al.* 2017), e pode minimizar surtos de doenças através da intensificação do controle vetorial (Vasconcelos *et al.* 2016, Abreu *et al.* 2019). Assim, especula-se que uma atuação incisiva de controle vetorial nas regiões onde mosquitos naturalmente infectados foram coletados poderia evitar a ocorrência de casos em humanos.

Nesta nova aplicação da espectroscopia NIR para detectar o ZIKV em mosquitos, descobrimos a precisão do NIR de 94,2 a 99,3% na diferenciação *Ae. aegypti* infectado e não infectado pelo ZIKV quando analisamos cabeças/tórax. Como nosso objetivo era detectar o ZIKV *in vivo*, não conseguimos distinguir as contribuições do próprio vírus a partir da resposta imunológica do mosquito ao analisar as alterações químicas e físicas associadas com alterações nos espectros NIR.

Atualmente, a detecção de ZIKV através da NIRS não está pronta para o campo, pois a heterogeneidade dos mosquitos coletados em campo deve ser incorporada aos modelos NIR para obter validação robusta para aplicações em campo. Amostras de campo são muito mais prováveis a serem dessecadas e danificadas do que os mosquitos em laboratórios e representam uma variedade de idades e *status* de alimentação. Portanto, os próximos passos no desenvolvimento da técnica incluem testá-la em populações de *Ae. aegypti* para determinar sua sensibilidade e especificidade para a detecção de arbovírus em relação ao RT-qPCR.

Aqui, calculamos que a detecção de ZIKV por NIRS foi 18 vezes mais rápida e 110 vezes mais barata do que RT-qPCR. Apesar disso, não reivindicamos o fim do RT-PCR, mas acreditamos que se usada como uma ferramenta de pré-seleção para RT-qPCR ou outras técnicas moleculares, NIRS pode gerar economia de tempo e recurso ao separar rapidamente os mosquitos sabidamente não-infectados. Aquelas cuja classificação pelo espectro foi duvidosa seriam posteriormente analisadas via

RT-qPCR. Como não há necessidade de dissecar ou manipular os mosquitos para NIRS, também é uma ferramenta mais segura do que aqueles ensaios que exigem manipulação de tecidos de mosquitos potencialmente infectados.

Um outro passo para uma vigilância eficiente de arbovírus é utilizar uma ferramenta que pode detectar a infecção em mosquitos que foram deixados em uma armadilha por um longo período de tempo. Aqui, ajustamos o tempo máximo de observação para uma semana. Ao mostrar que o NIRS é capaz de detectar ZIKV, CHIKV e *Wolbachia* em mosquitos mortos na BG-Sentinela, mostramos que é possível, reduzir o tempo e os custos necessários para recuperar essas amostras diariamente. Abordamos no segundo artigo 1) a capacidade do NIRS de prever o tempo após a morte de fêmeas de *Ae. aegypti* deixadas em uma armadilha BG sentinela por um período de 0-7 dias, 2) a capacidade do NIRS de detectar Zika, CHIKV e *Wolbachia* em mosquitos deixados nesta mesma armadilha também por 0-7 dias e 3) se o tempo após a morte dos mosquitos afetaram a capacidade do NIRS de detectar infecções nos mosquitos.

No presente estudo, obtivemos 93,2%, 97,0% e 90,3% de acurácia quando a NIRS foi usada para prever a infecção por Zika, CHIKV e *Wolbachia* em fêmeas de *Ae. aegypti* independentemente da hora da morte. Mais importante ainda, a previsão de NIRS dessas infecções de 7 dias após a morte não foi significativamente diferente de mosquitos frescos, mostrando a estabilidade do espectro em até uma semana após a morte do inseto. Surpreendentemente, o NIRS mostrou maior acurácia do que o RT-qPCR para detectar a infecção pelo ZIKV em mosquitos mortos, provavelmente devido à degradação do RNA viral na temperatura do insetário. Nossa hipótese é que a taxa de perda de água na presença de um arbovírus pode ser mais lenta do que a degradação do RNA viral, o que sustentaria a detecção de NIRS, mas prejudicaria abordagens baseadas em moléculas como o RT-qPCR. A NIRS previu a presença de Zika na cabeça e tórax com 97% de acurácia (Fernandes *et al.* 2018), parasitas da malária em *Anopheles gambiae* com 95% de acurácia (Maia *et al.* 2019) e a presença de wMel e wMelPop em fêmeas de *Ae. aegypti* com 93% e 96% de acurácia, respectivamente (Sikulu-Lord *et al.* 2016a). Estudos anteriores usaram mosquitos frescos (Fernandes *et al.* 2018, Maia *et al.* 2019) ou preservados em RNAlater (Sikulu-Lord *et al.* 2011) que foram criados, infectados e mantidos em ambiente com temperatura controlada e mortos com produtos químicos. Simulamos um cenário mais natural em que as fêmeas de *Ae. aegypti* foram mortas por agitação e deixadas em uma armadilha BG por um período

de 7 dias após sua morte. Evidentemente, por questões éticas, o experimento foi conduzido em ambiente de laboratório.

Uma acurácia levemente maior foi observada para *Ae. aegypti* infectado com CHIKV do que para mosquitos infectados com ZIKV (Tabela 1). Essas diferenças na acurácia podem ser atribuídas a mudanças virais específicas em mosquitos após uma infecção (Dubrulle *et al.* 2009, Vasconcelos *et al.* 2016, Roundy *et al.* 2017), títulos iniciais usados para infectar mosquitos e a composição química geral de um mosquito após uma infecção que acaba afetando sua assinatura espectral. Notamos que não houve mudanças lineares na predição, acurácia ou sensibilidade para todas as infecções durante o período de amostragem de 7 dias. Por exemplo, a maior acurácia para ZIKV, CHIKV e *Wolbachia* foi observada nos dias 2, 6 e 7 após a morte, respectivamente. Os autores especulam que a taxa de perda de água após a morte de um mosquito pode ser relativa ao tipo de infecção transmitida por esse mosquito. No entanto, aos 7 dias após a morte, todas as infecções foram previstas com uma precisão relativamente maior em comparação com mosquitos frescos, possivelmente indicando o pico de perda de água, independentemente do tipo de infecção. No entanto, a precisão > 90% do NIRS para detectar ZIKV ou CHIKV em *Ae. aegypti* capturado vários dias após a morte foi impressionante e indica o potencial futuro da aplicação da ferramenta para este propósito.

A liberação de *Ae. aegypti* infectado com *Wolbachia* tem o potencial de se tornar um componente-chave da estratégia de controle de doenças no futuro. Na última década, *Wolbachia* foi liberada em pequenos locais isolados e em grandes cidades. Ensaio rápidos para avaliar seu efeito em larga escala são fundamentais para avaliar sua eficácia (Nguyen *et al.* 2015)

et al. 2019, O'Neill *et al.* 2018). Aqui, demonstramos a capacidade do NIRS em detectar *Wolbachia* em fêmeas de *Ae. aegypti* até 7 dias após a morte. Embora uma acurácia superior a 85% tenha sido alcançada ao longo do período de amostragem de 7 dias, a precisão do NIRS na detecção de *Wolbachia* foi ligeiramente menor do que para *Ae. aegypti* infectado por CHIKV e ZIKV. Nossa hipótese pode estar relacionada às diferenças entre as respostas imunológicas de um vírus e uma bactéria, bem como a distribuição do vírus e da bactéria dentro do mosquito. A cepa wMel do endossimbionte *Wolbachia* está presente em densidades mais altas em tecidos específicos, notadamente nos ovários (Dutra *et al.* 2015). Os espectros de mosquitos infectados e não infectados foram coletados das cabeças e tórax onde a densidade de *Wolbachia* ainda é significativa, mas em densidades mais baixas do

que os ovários para mitigar os efeitos do conteúdo abdominal nos espectros que poderiam ter um efeito na acurácia dos mosquitos infectados com *Wolbachia*. Trabalhos futuros podem investigar se a varredura de outras partes do mosquito melhora a precisão atual e se a *Wolbachia* também pode ser detectada em mosquitos machos vários dias após a morte de um mosquito.

O monitoramento da circulação de arbovírus em mosquitos capturados pode aumentar significativamente o conhecimento sobre a transmissão silenciosa de DENV, ZIKV e CHIKV em ambientes endêmicos (Singh *et al.* 2000, Pettersson *et al.* 2018, Torres *et al.* 2019). Como transmissão silenciosa, definimos infecções que resultam em sintomas não perceptíveis (assintomáticos) ou sintomas leves que não são detectados pelos sistemas de vigilância de rotina (ten Bosch *et al.* 2018). Infecções silenciosas têm um papel significativo na transmissão de arbovírus, uma vez que infecções clínicas aparentes podem ser responsáveis por mais de 80% da transmissão de DENV (ten Bosch *et al.* 2018). Essas descobertas podem desencadear o emprego de um sistema de vigilância baseado em armadilhas, por meio do qual a detecção rápida de patógenos em mosquitos aprisionados pode informar aos gestores de saúde a conduzir pesquisas sorológicas transversais em famílias próximas. Ao fazer isso, práticas integradas de gestão de vetores, como mobilização social, empoderamento das comunidades, intensificação do controle de vetores e abordagens assertivas de gestão de casos, podem impactar localmente a transmissão da doença.

Os mosquitos usados neste experimento foram mortos por agitação para imitar a morte natural, ou seja, sem produtos químicos. Os mosquitos foram adicionados ao saco de captura de uma armadilha BG-Sentinel, um microambiente hostil produzido pelo ventilador que sopra constantemente para reter os mosquitos presos. O NIRS previu o tempo após a morte com base na redução do teor de umidade / água ao longo do tempo. Isso pode ser observado no espectro mostrado na figura 2, onde as amostras frescas são caracterizadas por amplos tons de picos relacionados à água em torno de 1450nm e 1950nm e pelos quais esses picos começam a diminuir 7 dias após a morte.

Os resultados apresentados aqui são um primeiro passo para o desenvolvimento de sistemas robustos de vigilância de arbovírus que podem ser usados para prever infecções em mosquitos em diferentes momentos. A detecção de arbovírus em configurações de campo exigiria experimentos adicionais para levar em conta as condições ambientais flutuantes adicionais no campo enquanto os

mosquitos estão presos. Além disso, reconhecemos o fato de que uma única coorte de mosquitos foi usada para desenvolver modelos preditivos para CHIKV. Experimentos adicionais para avaliar este efeito seriam essenciais antes da utilização em um ambiente de campo.

Uma das desvantagens do NIRS é a necessidade de comprar um espectrômetro com sensibilidade alta o suficiente para identificar o vírus. O custo estimado de espectrômetros de bancada disponíveis no mercado que são sensíveis suficiente (definido por uma alta relação sinal-ruído) para coletar espectros de mosquitos é de US \$ 60.000. Devido às restrições orçamentárias frequentemente enfrentadas pelos setores de saúde pública em muitos países com doenças endêmicas, pode ser necessário estabelecer centros de processamento NIRS para digitalizar amostras de mosquitos enviado de regiões ou países inteiros. Como não há necessidade de reagentes, o custo de aquisição desse espectrômetro seria recuperado após escanear aproximadamente 10.000 mosquitos. Ou seja, a adoção de uma vigilância entomo-viológica como prática de rotina em um município poderia ser uma maneira de retorno financeiro em curto espaço de tempo. Além disso, traria uma informação ainda desconhecida dos gestores de saúde, que é a localização espaço-temporal de mosquitos naturalmente infectados. Microspectrômetros mais acessíveis estão disponíveis comercialmente por menos de US \$ 500; no entanto, a sensibilidade desses espectrômetros precisa ser testada por causa de sua menor resolução, ruído inerente e alcance mais limitado de comprimentos de onda. Como a tecnologia evolui e o mercado de espectrômetros cresce, o custo e tamanho dos espectrômetros deverá diminuir significativamente.

Uma outra desvantagem da NIRS é a necessidade de desenvolver uma biblioteca de dados separada para cada arbovírus ou patógeno de interesse. No entanto, uma vez que uma biblioteca com dados robustos para detecção de patógenos em mosquitos de campo é estabelecida para um dado país, a biblioteca de dados poderá então ser empacotada e usada por programas de controle de mosquitos em todo o país para rastrear infecções por ZIKV em amostras de campo desconhecidas sem a necessidade de criar novos modelos. Se a NIRS for tão precisa na detecção do ZIKV em mosquitos de campo como no laboratório, então a rapidez, a relação custo-benefício e o fato da técnica ser não invasiva, a tornaria uma tecnologia atraente para a vigilância de vírus transmitidos por mosquitos no futuro.

Os dados NIRS podem ser analisados por uma série de pacotes de software disponíveis comercialmente, também como programas de código aberto gratuitos construídos em R. Os dados também podem ser salvos em uma variedade de formatos que podem ser incorporados ao suporte de sistemas baseados em análise de multicritério, semelhante ao sistema proposto para o controle do Ebola (Phelps *et al.* 2017). Informações sobre a circulação do patógeno tem sido o elemento chave que falta nos modelos preditivos de arbovírus até agora.

Espera-se que os modelos atuais para ZIKV, CHIKV e *Wolbachia* precisem ser modificados, incluindo amostras de campo no modelo de treinamento para capturar fatores de confusão, como dieta, microbioma, temperatura e umidade flutuantes antes da aplicação em campo (David *et al.* 2016). No entanto, esses resultados são encorajadores e facilitarão o progresso em direção ao desenvolvimento de sistemas de vigilância de arbovírus rápidos e de alto rendimento.

Sabemos da grande especulação em saber se a espectroscopia no infravermelho próximo poderá ser utilizada para a detecção de vírus dengue em mosquitos, uma vez que este circula há tanto tempo entre nós. Nosso grupo verificou que é possível utilizar a NIRS para esta identificação, entretanto as informações não entraram nesta tese, pois os dados ainda não foram divulgados. Também realizamos experimentos onde alimentamos os mosquitos com mais de um tipo de vírus, uma coinfeção, porque podemos encontrar na natureza mosquitos com mais de um tipo de vírus, e verificamos que a espectroscopia pode identificar este grupo de indivíduos.

O treinamento de uma pessoa para utilizar o equipamento de espectroscopia pode ser feito em um dia, ou seja, aprender a posição dos mosquitos na placa espectral, quais programas são utilizados para coletar os espectros e transformá-los em uma outra extensão (para serem analisados estatisticamente) e enviar para quem fará estas análises. Entretanto, para uma análise estatística é necessário que a pessoa seja qualificada para isto, por isso é importante parcerias com outros grupos que tenham este domínio.

5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a espectroscopia no infravermelho próximo pode diferenciar mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* criados e mantidos em laboratório, infectados e não infectados por Zika.

Foi calculada que a detecção do ZIKV pelo NIRS foi 18 vezes mais rápida e 110 vezes mais barata que o RT-qPCR. Dada a técnica rápida, com alta produtividade e livre de reagentes, centenas de amostras podem ser processadas em um dia por técnicos, permitindo rápidas previsões de potencial de transmissão de doenças, o que, por sua vez, poderia facilitar um plano de ação para deter os principais surtos de doenças.

A acurácia superior a 90% foi observada quando utilizamos a NIRS para prever a infecção por Zika, CHIKV e *Wolbachia* em fêmeas de *Ae. aegypti* na armadilha BG sentinela independentemente da hora da morte em laboratório.

Sete dias após a morte, todas as infecções foram previstas com precisão relativamente superior aos mosquitos frescos.

A NIRS foi capaz de prever o tempo de morte das fêmeas entre 0-7 dias.

Embora ainda precisemos ajustar os modelos desenvolvidos em laboratório com amostras coletadas em campo de maneira a ficarem mais robustos, acreditamos que a detecção rápida de arbovírus em mosquitos pela NIRS tem o potencial de melhorar a qualidade e oportunidade de dados de vigilância, acelerando assim as respostas aos surtos de arbovírus.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu FVS, Delatorre E, Santos AAC *et al.* 2019. Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 114.

Alto BW, Lounibos LP, Higgs S, Juliano SA 2005. Larval competition differentially affects arbovirus infection in *Aedes* mosquitoes. *Ecology* 86: 3279-3288.

Alto BW, Reiskind M, Lounibos LP 2008a. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. *Am J Trop Med Hyg* 79: 688-695.

Alto BW, Lounibos LP, Mores CN, Reiskind MH 2008b. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquito to dengue infection. *Proc Biol Sci* 275: 463-471.

Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Shaw WR *et al.* 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature*.
Chavasse DC, Yap HH 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. World Health Organization.

Baptista MM e Rio D 2013. Definition of infrared spectroscopy. Horus Podutora de Áudio. Disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=Jd5DbZAKNO4> Acessado em 29/04/2020.

Barnes RD, Ruppert EE, Fox RS 2005. Zoologia de invertebrados. 4ª ed., Rocca, São Paulo.

Barrera R, Amador M, Diaz A, Smit HJ, Munoz-Jordan J. L. and Rosario Y 2008. Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. *Medical and Veterinary Entomology* 22, 62–69.

Barreto ML e Teixeira MG 2008. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos avançados* 22 (64).

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, *et al.* 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507.

Borges E 2016. Pesquisadores usam radiação para impedir reprodução de *Aedes aegypti*. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/pesquisa-e-inovacao/noticia/2016-02/pesquisadores-usam-radiacao-para-impedir-reproducao-do-aedes> Acessado em 03/11/2020.

Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MA 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.

Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16(2) 113-118.

Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16(4): 279-293.

Braks MAH, Honorio NA, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano AS, Lounibos LP 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol* 40: 785-794.

Brito AF, Ribeiro IP, Miranda R, Fernandes RS *et al.* 2016. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.

Burns DA e Ciurczak EW 1992. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Marcel Dekker, Inc.: New York.

Burns DA e Ciurczak EW 2008. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. CRC press. 3rd ed.

Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ESM, de Sequeira PC, de Mendonça MCL, de Oliveira L, Tschoeke DA, Schrago CG, Thompson FL, Brasil P, dos Santos FB, Nogueira RMR, Tanuri A, & de Filippis AMB. 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 653–660.

Castro RO, Silva ML, Marques MRC, Araújo FA 2016. Evaluation of microplastics in Jurujuba Cove, Niterói, RJ, Brazil, an area of mussels farming. *Marine Pollution Bulletin*.

Campos GS, Bandeira AC, & Sardi SI. 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1885–1886.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, *et al.* 2014. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 20(6):1085-6. doi: 10.3201/eid2006.140138.

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

Chen A, Rogan WJ. Nonmalarial infant deaths and DDT use for malaria control 2003. *Emerging Infectious Diseases* 9(8):960-964.

Coelho FC & Codeço CT 2019. Precision epidemiology of arboviral diseases. *J. Public Heal. Emerg.*

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro.

Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Lima AF, Cunha MDP, Wiley MR, *et al.* 2017. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* ; 14;11(6):e0005630.

Cunha SP, Carreira Alves JR, Lima MM, Duarte JR, Barros LCV, Silva JL, Gammaro AT, Monteiro Filho OS, Wanzeler AR 2002. Presença de *Aedes aegypti* em

Bromeliaceae e depósitos com plantas no município do Rio de Janeiro, RJ. Rev Saude Pública 36: 244-245.

David MR, Santos LMBDos, Vicente ACP, Maciel-de-Freitas R 2016. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: Evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.

da Costa PA e Poppi RJ 2001. Determination of triglycerides in human plasma using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration methods. Anal. Chim. Acta. Vol 446.

Delecave B 2011. A ciência das cores. Disponível em: http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1095&sid=9&tpl=printer_view. Acessado em: 29/04/2020.

Degener CM, Ázara TMF, Roque RA, Codeço CT, Nobre AA, JJ Ohly, Geier M, Eiras AE 2014. Temporal abundance of *Aedes aegypti* in Manaus, Brazil, measured by two trap types for adult mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz vol. 109(8): 1030-1040.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Trans R Soc Trop Med Hyg. 46(5):509-520.

Donalísio MR, Glasser CM 2002. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. Rev. Bras. Epidemiol vol. 5, nº 3.

Dowell FE, Throne JE, James Baker JE 1998. Automated Nondestructive Detection of Internal Insect Infestation of Wheat Kernels by Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. Jounnar, of Economic Entomology.

Dowell FE, Throne JE, Wang D, James Baker JE 1999. Identifying Stored-Grain Insects Using Near-Infrared Spectroscopy. Jounnar, of Economic Entomology.

Dowell FE, Fernandes JN, Sikulu-Lord M 2017. Espectroscopia no infravermelho próximo Aplicação à Medição de Atributos Entomológicos. United States Department of Agriculture (USDA).

Duarte J, Pacheco MTT, Machado RZ, Silveira L, Zangaro RA, Villaverde AB 2002. Use of near-infrared Raman spectroscopy to detect IgG and IgM antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum samples of domestic cats. Cell Mol. Biol. Vol 48.

Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M e Failloux A 2009. Chikungunya Virus and *Aedes* Mosquitoes: Saliva Is Infectious as soon as Two Days after Oral Infection. PLoS One 4, e5895.

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 de Mestrado.

Dutra HLC *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.

- Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA 2016. *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. Cell Host Microbe. 8;19(6):771-774.
- Edman JD, Scott TW, Costero A, Morrison AC, Harrington LC, Clark GG 1998. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. J Med Entomol 35:578-83.
- Ecovec 2017. Os custos das arboviroses para os cofres públicos. Acessado em 26/09/2020. Disponível em: <http://blog.ecovec.com/2017/09/14/os-custos-das-arboviroses-para-os-cofres-publicos/>
- Ellwanger JH, Kaminski VdeL, Chies JAB 2017. How to detect new viral outbreaks or epidemics? We need to survey the circulation of viruses in humans and other animals using fast, sensible, cheap, and broad-spectrum methodologies. Brazilian J. Infect. Dis.
- Enserink M 2007. Infectious diseases. Chikungunya: no longer a third world disease. Science. 21;318(5858):1860-1861.
- Esperança PM, Blagborough AM, Dari FD, Dowell FE and Churcher TS 2018. Detection of Plasmodium berghei infected *Anopheles stephensi* using near-infrared spectroscopy. Parasites & Vectors.
- Evans BR, Kotsakiozi P, Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Garziera L, Pedrosa MC, Malavasi A, Virginio JF, Capurro ML & Powell JR 2019. Transgenic *Aedes aegypti* Mosquitoes Transfer Genes into a Natural Population. Scientific Reports 9:13047.
- Fares RCG, Souza KPR, Añez G, Rios M 2015. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. BioMed Research International.
- Farnesi LC, Menna-Barreto RF, 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. J Insect Physiol 83:43-52.
- Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, et al. 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. PLoS Negl Trop Dis. 8(1):e2636. doi: 10.1371/journal.pntd.0002636.
- Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, Keli Antunes Barbosa da Silva KAB et al. 2016. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus PLoS Negl Trop.
- Fernandes JN et al. 2018. Rapid, noninvasive detection of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes by near-infrared spectroscopy. Sci. Adv.
- Ferreira C, Yang H, Esteva L 2008. Assessing the suitability of sterile insect technique applied to *Aedes aegypti*. Journ Biolog Syst.

- Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE 1995. A simulation model of the epidemiology of Urban dengue fever: literature analysis, Model development, preliminary validation, And samples of simulation results. Am. J. Trop. Med. Hyg.
- Focks DA, Chadee DD 1997. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. Am J Trop Med Hyg.
- Focks DA 2003. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. UNICEF/UNDP/WORLD BANK/WHO . Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68575/TDR_IDE_DEN_03.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Franco O 1969. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde.
- Fundação Oswaldo Cruz. Acessado em 19 de abril de 2020. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html>.
- Fundação Oswaldo Cruz. Acessado em 04 de agosto de 2020. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti>.
- Garcia GA, Santos LMB, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R 2016. Using *Wolbachia* Releases to Estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Population Size and Survival. PLoS ONE
- Garcia GA 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 de Doutorado.
- Garcia GdA, Sylvestre G, Aguiar R, da Costa GB, Martins AJ, Lima JBP, *et al.* 2019. Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure *Wolbachia* invasion. PLoS Negl. Trop. Dis.
- Garziera L, Pedrosa MC, Souza FA, Gomez M, Moreira MB, Virginio JF, Capurro ML & Carvalho DO 2017. Effect of interruption of over-flooding releases of transgenic mosquitoes over wild population of *Aedes aegypti*: two case studies in Brazil. Entomol. Experiment. Appl.
- Gomes AC 2002. Vigilância Entomológicas. Inf. Epidemiol. Sus v.11 n.2 Brasília.
- Gouveia R. 2020. Ondas Sonoras. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/ondas-sonoras/amp/>. Acessado em: 19-09-2020.
- Gubler DJ, Kuno G 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Wallingford: CAB International.
- Gubler DJ 1998. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." Clin Microbiol Rev. 11(3): 480.
- Gubler DJ 1998. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." Clin Microbiol Rev. 11(3): 480.

Guchardi R, Costa PA, Poppi RJ, Pasquini C 1998. Determination of Ethanol and Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE) in Gasoline by NIR–AOTF-based Spectroscopy and Multiple Linear Regression with Variables Selected by Genetic Algorithm J. Near Infrared Spectrosc.

Halstead SB 2002. Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. Revista cubana de Medicina tropical.

Halstead SB 2008. Dengue-virus mosquito interactions. Annu Rev Entomol.

Harrington LC, Edman JD 2001. Indirect evidence against delayed “skip oviposition” behavior by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. J Med Entomol.

Harrington LC, Edman JD, Scott TW 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? J Med Entomol .

Higgs S, Vanlandingham D 2015. Chikungunya virus and its mosquito vectors. Vector Borne Zoon Dis. 15(4):231-40. doi: 10.1089/vbz.2014.1745.

Hoffmann AA, Montgomery BL, J. Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, M. Durkan, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O’Neill SL 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature.

Honório NA e Lourenço-de-Oliveira R 2001. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. Rev. Saúde Pública.

Honório NA, Silva WC, Paulo José Leite, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Honório NA, Cabello PH ,Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R 2006. Preliminary data on the performance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* immatures developing in waterfilled tires in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz.

Honório NA 2009. Indicadores da distribuição espacial e temporal de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) associados às variáveis climáticas, ambientais e transmissão de dengue. Tese de doutorado.

Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM 2018. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. PLoS ONE 13(12): e0210122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210122>.

Kowalski BR 1980. Chemometrics. Analytical Chemistry.

- Kröckel U, Rose A, Eiras AE, and Geier M 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, *et al.* 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 14(8):1232-9. doi: 10.3201/eid1408.080287.
- Lounibos LP 2002. Invasion by insect vectors of human diseases. *Annu Rev Entomol.*
- Lourenço-de-Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, Silva WC, Leite PJ, Nogueira RMR 2002. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*
- Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AMB, Failloux AB 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*
- Machado PA 1987. O homem, os insetos, passado, presente, futuro. *Revista de Saúde Pública.*
- Maciel-de-Freitas R, Eiras AE, Lourenço-de-Oliveira R 2006. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.*
- 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.*
- Maciel-de-Freitas R, Peres RC, Alves F, Brandolini MB 2008. Mosquito traps designed to capture *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females: preliminary comparison of Adultrap, MosquiTRAP and backpack aspirator efficiency in a dengue-endemic area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*
- 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.*
- Maciel-de-Freitas 2010. Avaliação de aspectos da capacidade vetorial de fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no Rio de Janeiro. Tese de doutorado apresentada a Coordenação de Pós Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz.
- 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 alternative tools to control mosquito-borne disease in Latin America? *Mem Inst Oswaldo Cruz.*

Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, Lima JBP, Martins AJ, Coelho GE e Valle D 2014. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. PLoS ONE.

Maciel-de-Freitas R e Valle D 2014. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil. Bulletin of the World Health Organization.

Maia MF *et al.* 2019. Detection of *Plasmodium falciparum* infected *Anopheles gambiae* using near-infrared spectroscopy. Malar. J.

Martinez-Torres M E 1990. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Marti, 180p.

Mian LS, Mulla MS 1982. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. Residue Rev.

Miller S, Romero-Brey I, Bartenschlager R 2010. The Dengue Virus Replication Complex. In: Hanley KA, Weaver SC, editors. Frontiers in Dengue Virus Research. 1ª ed: Caister Academic Press. p. 35-53.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2005. Avaliação da eficácia de análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina no controle de *Aedes aegypti*.

Ministério da Saúde 2014. Controle de Vetores. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/controle-de-vetores>. Acessado em: 13/09/2020.

Min KT, Benzer S 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10792–10796.

Mocellin MG, Simões TC, Nascimento TFS, Teixeira MLF, Lounibos PL, Lourençode-Oliveira R 2009. Bromeliad-inhabiting mosquitoes in an urban botanical garden of dengue endemic Rio de Janeiro. Are bromeliads productive habitats for the invasive vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? Mem Inst Oswaldo Cruz vol.

Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, *et al.* 2014. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. PloSNeglTrop Dis 8(9): e3167. doi:10.1371/journal.pntd.0003167.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JAL, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Higo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya and *Plasmodium*. Cell.

Moscamed 2020. O Projeto Aedes Estéril .Disponível em: <http://moscamed.org.br/2020/05/04/o-projeto-aedes-esteril-pae-reduz-populacao->

do-mosquito-aedes-aegypti-na-comunidade-b-teimosa-com-o-uso-de-estacoes-disseminadoras-de-piriproxifem/ Acessado em: 15/09/2020.

MS/SVS 2005. Guia de vigilância epidemiológica, 6a Ed, 253 pp. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.

Musso D 2015. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21(10):1887. doi: 10.3201/eid2110.151125.

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FBS, Cunha RV *et al.* 2005. Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002. *Emerging Infectious Diseases.*

Nogueira RMR, Eppinghaus ALF 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*

Nguyen TH *et al.* 2015. Field evaluation of the establishment potential of *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasit. Vectors.*

Nishiyama P, Alvarez M, Vieira LGE 1991. Determinação dos teores de steviosídeo e carboidratos solúveis nas folhas de *Stevia rebaudiana* por Espectroscopia de Reflectância no Infravermelho Próximo (ERIP). *Arq. Biol. Technol.*

Nishiyama P, Alvarez M, Vieira LGE 1992. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Sci. Food Agr.*

Nunes MRT, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MUG, de Oliveira LF, da Silva Azevedo R do S, da Silva DEA, da Silva EVP, da Silva SP, Carvalho VL, Coelho GE, Cruz ACR, Rodrigues SG, da Silva Gonçalves Vianez JL, Nunes BTD, Cardoso JF, Tesh RB, Hay SI, da Costa Vasconcelos PF 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine.*

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

Osanaí CH 1984. A epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981-1982. Dissertação de mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ.

O'Neill SL *et al.* 2018. Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses. *Gates Open Res.*

Palchick S 1996. Chemical Control of Vectors In: *The Biology of Disease Vectors.* Colorado: University Press of Colorado.

Pasquini, C, da Silva HEB, Guchardi R 2000. In *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 9 th International Conference.* Davies, AMC; Giangiaco R. eds., NIR Publications: Chichester.

Pasquini C. 2003. *Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications.* J. Braz. Chem. Soc.

- Pasquini C 2018. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives e A review.
- Patterson J, Sammon M, Garg M 2016 Dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the new world. *West J Emerg Med.* 17(6):671-679.
- Patterson J, Sammon M, Garg M 2016. Dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the new world. *West J Emerg Med.*
- Penna MLF 2003. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cad Saúde Pública.* 19:305-309.
- Pessanha JEM, Caiaffa WT, Cecílio AB, Iani FCM, Araujo SC, Nascimento JC *et al.* (2011). Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*
- Pettersson JHO *et al.* 2018. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. *Emerg. Microbes Infect.*
- Phelps C, Madhavan G, Rappuoli R, Colwell R, Fineberg H 2017. Beyond cost-effectiveness: Using systems analysis for infectious disease preparedness. *Vaccine* 35.
- PNCD-Programa Nacional de Controle da Dengue 2002. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.
- Popovici J, Moreira LA, Poinsignon A, Iturbe-Ormaetxe I , McNaughton D, Scott L O'Neill 2010. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 105(8): 957-964.*
- Poppi RJ e Souza AM 2019. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos empregando Espectroscopia no Infravermelho Próximo. Guia do Curso. Extecamp. Qui-0057.
- Post LC, Mulder R 1974. Insecticidal properties and mode of action of 1-(2,6-dihagenzoyl)-3-phenylureas CA: American Chemical Society National Meeting.
- Regis L, Monteiro AM, Melo-Santos MAV, Silveira JCJr, Furtado AF, Acioli RV, Santos GM, Nakazawa M, Carvalho MS, Ribeiro PJJr, Souza WV 2008. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.103 no.1 Rio de Janeiro.*
- Rey, L. 2008. *Parasitologia.* 4ª ed. Guanabara.
- Robinson MC 1955. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
- Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*

Rose RI 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg Infect Dis*.

Roundy CM *et al.* 2017 Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. *Emerg. Infect. Dis*.

Rousch RT, MCKenzie JA 1987. Ecological genetics of insecticide and resistance. *Ann Rev Entomol*.

Rozendaal JA 1997. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*.

Santos AF, Lima EL, Pinto JC. 1998. In-line evaluation of average particle size in styrene suspension polymerizations using near-infrared spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci*.

Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso-Júnior RP 2008. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) from Brazil. *Am J Trop Med Hyg*.

Schuler-faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, Horovitz DDG e Cavalcanti DP 2016. Possível associação entre a infecção pelo vírus zika e a microcefalia - Brasil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*.

Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, Kittayapong P, Edman JD 2000. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood feeding frequency. *J Med Entomol*.

Shapiro HM 1986. In memoriam: tomas hirschfeld (1939-1986). *Cytometry*.

Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH 2011. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*.

Sikulu M, Dowell KM, Hugo LE *et al.* 2011. Avaliação do RNA *later* como um conservante para o uso de espectroscopia no infravermelho próximo para prever a idade e a espécie do *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*.

Sikulu-Lord MT, Maia MF, Milali MP, Henry M, Mkandawile G, Kho EA, Wirtz RA, Hugo LE, Dowell FE, Devine GJ 2016a. Rapid and non-destructive detection and identification of two strains of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* by near-infrared spectroscopy. *PLOS Negl. Trop. Dis*.

Sikulu-Lord M, Milali MP, Henry M, Wirtz RA, Hugo LE, Dowell FE, Devine GJ 2016b. Near-infrared spectroscopy, a rapid method for predicting the age of male and female wild-type and *Wolbachia* infected *Aedes aegypti*. *PLOS Negl. Trop. Dis*.

Silva BL 2017. Sistema De Medição Não Invasiva De Glicose Sanguínea Baseado Em Princípios De Espectroscopia De Infravermelho Próximo. Dissertação submetida

ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Silva RC, Langoni H 2009. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.5, p.1614-1623. ISSN 0103-8478.

Simmons CP, Farrar JJ, Chau NVV, Wills Bridget 2012. *Dengue*. *N Engl J Med*.

Singh J *et al.* 200. Silent spread of dengue and dengue haemorrhagic fever to Coimbatore and Erode districts in Tamil Nadu, India, 1998: need for effective surveillance to monitor and control the disease. *Epidemiol. Infect.*

Slama K, Romanuk M, Sorm F 1974. *Insect Hormones and Bioanalogues*. New York:Springer Verlag.

Stahl *et al.* 2013. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies *BMC Public Health*.

Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 356, 983–989.

ten Bosch QA *et al.* 2018. Contributions from the silent majority dominate dengue virus transmission. *PLOS Pathog.*

Teich V, Arinelli R, Fahham L 2017. *Aedes aegypti* and society: the economic burden of arboviruses in Brazil. *J Bras Econ Saúde*.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 1999. *Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue*. Informe Epidemiológico do SUS vol.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cadernos de Saúde Pública* vol.21.

Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alpheys LS 2000. Insect population control using a dominant repressible, lethal genetic system. *Science*.

Torres MC *et al.* 2019. Re-introduction of dengue virus serotype 2 in the state of Rio de Janeiro after almost a decade of epidemiological silence. *PLoS One*.

Tun-Lin W, Lenhart A, Nam VS, Rebollar-Teñlez, E, Morrison, AC, Barbazan P, Cote M, Midega, Sanchez F, Manrique-Saide P, Kroeger A, Nathan MB, Meheus F and Petzold M. 2009. Reducing costs and operational constraints of dengue vector control by targeting productive breeding places: a multi-country non-inferiority cluster randomized trial. *Trop Med Int Health*.

Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Martins Junior AJ 2019. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio De Janeiro

Vasconcelos PFC, Calisher CH 2016. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000–2016. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*

- Vazquez-Prokopec GM, *et al.* 2010. Unforeseen costs of cutting mosquito surveillance budgets. *PLoS Negl Trop Dis*.
- Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R. 2014. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of chikungunya virus. *J. Virol*.
- Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Mousson L, Vazeille M, Fuchs S *et al.* 2015. Chikungunya Virus Transmission Potential by Local *Aedes* Mosquitoes in the Americas and Europe. *PLoS Negl Trop Dis*.
- Vieira RAM, Sayer C, Lima EL, Pinto JC 2002. ClosedLoop Composition and Molecular Weight Control of a Copolymer Latex Using Near-Infrared Spectroscopy. *Ind. Eng. Chem*.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476.
- Ware GW 2000. An introduction to insecticides [monografia na Internet]. 3rd ed. University of Minnesota. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>
- Weaver SC, Reisen WK 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85(2):328-45. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*.
- WHO 1997. Executive committee of the directing council the regional committee Pan American World Health 120th Meeting CE120/21.
- Williams MC, Woodall JP, Gillett GD 1965. O'nyong nyong fever: an epidemic virus disease in East Africa VIII. Virus isolations from Anopheles mosquitoes. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Zammarchi L, Tappe D, Fortuna C, Remoli ME, Günther S, Venturi G, Bartoloni A e Schmidt-Chanasit J 2015. Zika virus infection in a traveller returning to europe from Brazil, march 2015. *Eurosurveillance*.
- Zanluca C, Campos V, Melo A De, Luiza A, Mosimann P, Igor G, Nunes C e Luz K 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. 110(June).
- Zara AL, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE 2016. *Aedes aegypti* control strategies: a review. *Epidemiol Serv Saude*.