



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**



**DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes*
aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e *Aedes*
albopictus (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) CAPTURADOS
NA ZONA URBANA DA CIDADE DE MANAUS,
AMAZONAS.**

ILIA GILMARA CARVALHO DOS SANTOS

**MANAUS
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

ILIA GILMARA CARVALHO DOS SANTOS

**DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes
aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e *Aedes
albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) CAPTURADOS
NA ZONA URBANA DA CIDADE DE MANAUS,
AMAZONAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de mestre em patologia Tropical na área de concentração Diagnóstico e Controle e linha de pesquisa Estratégias para Controle e Diagnóstico.

Orientador: Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa

**MANAUS
2008**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Santos, Ilia Gilmará Carvalho dos

S237d Detecção do vírus dengue em mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) capturados na zona urbana da cidade de Manaus, Amazonas / Ilia Gilmará Carvalho dos Santos. - Manaus: UFAM, 2008.

59 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) — Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa

1. Dengue – Vírus 2. *Aedes aegypti* 3. *Aedes albopictus* I. Costa, Cristóvão Alves da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 595.77(811.3)(043.3)

ILIA GILMARA CARVALHO DOS SANTOS

DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e *Aedes albopictus* (Skuse 1894) (Diptera: Culicidae) CAPTURADOS NA ZONA URBANA DA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de mestre em patologia Tropical na área de concentração Diagnóstico e Controle e linha de pesquisa Estratégias para Controle e Diagnóstico.

Aprovada em 31 de Outubro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Jansen Fernandes Medeiros, Membro Externo
Universidade Estadual do Amazonas

**MANAUS
2008**

DEDICATÓRIA ESPECIAL
(In Memoriam)

A minha mãe Juraci Carvalho dos Santos que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade.

DEDICATÓRIA

A meu pai Jamil Feitosa dos Santos cujas lições de generosidade e respeito ao próximo contribuíram para minha formação pessoal, pela dedicação e amor incondicional a mim dispensados;

A meus irmãos Roberto Santos, Carlos Santos e Gilberto Santos pelo apoio e companheirismo;

A meus tios Adriana Lima e João Lima por me acompanharem em todas as etapas da minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa pela orientação em todas as etapas deste trabalho e conhecimento partilhado, por seu apoio científico e humano e pela confiança em mim depositada para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir avançar mais esta etapa em minha vida.

A Universidade Federal do Amazonas, UFAM, ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical pela possibilidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Laboratório de Virologia, na pessoa do Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa que me recebeu gentilmente e que tornou possível a realização desta dissertação.

A Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, FMTAM, Laboratório de Entomologia, nas pessoas da Dra. Maria das Graças Barbosa e sua equipe pelo apoio na coleta dos mosquitos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, FAPEAM, pelo suporte financeiro, sem o qual não teria sido possível a realização deste estudo.

A Capes e a Fapeam pela concessão de minha bolsa de estudo.

Aos docentes do mestrado em Patologia Tropical, UFAM, pelos ensinamentos recebidos.

A bióloga Rossicleide Dias pela colaboração na coleta e taxonomia dos mosquitos.

Aos estagiários Renah Pimentel e Suziane Viana, pela colaboração na coleta e processamento das amostras.

Aos colegas do mestrado em Patologia Tropical, UFAM, pelo saudável convívio.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, o meu muitíssimo obrigada.

RESUMO

O estudo teve por objetivo a detecção e tipagem do vírus dengue, nos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos. Durante o período de Dezembro de 2005 a Dezembro de 2006 foram coletados 8984 mosquitos, destes 827 eram Aedes, sendo 819 *Ae. aegypti* (414 fêmeas e 405 machos) e 8 *Ae. albopictus* (7 fêmeas e 1 macho), em 46 bairros da cidade de Manaus abrangendo todas as zonas geográficas da cidade. As fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram agrupadas em *pools* de 1 a 10 mosquitos por microtubos, de acordo com o gênero, data de coleta, bairro e estocado a -70°C no mesmo dia da coleta, totalizando 143 *pools* (138 de *Ae. aegypti* e 5 de *Ae. albopictus*). Esses *pools* foram macerados em PBS contendo albumina, e uma alíquota do macerado foi retirada para inoculação em cultura de célula, e outra alíquota foi utilizada para realizar a extração do RNA viral. Uma vez extraído, o RNA foi submetido a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). As amostras positivas na RT-PCR foram submetidas a reação de Semi *Nested* PCR e os produtos desta reação foram resolvidos em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Dos 143 *pools* analisados, 114 (111 de *Ae. aegypti* e 3 de *Ae. albopictus*) foram positivos para DENV 3, apenas um *pool* mostrou-se positivo para dois sorotipos, DENV 1 e DENV 3. A prevalência de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com DENV 3 na cidade de Manaus foi de 80%. Em todas as zonas a prevalência foi maior que 53%, sendo maior nas zonas Centro-oeste (70%), Sul (60%) e Oeste (53%), e menor na zona Leste (23%). Este foi o primeiro achado no Brasil da identificação do DENV 3 em amostras de *Ae. albopictus*, coletados em campo na forma adulta. O monitoramento da circulação viral em mosquitos com o uso da técnica de RT-PCR permite o conhecimento prévio dos níveis de disseminação viral em determinadas áreas contribuindo para determinar a época e local para aplicar as medidas de prevenção e controle.

Palavras chave: Vírus Dengue, RT-PCR, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*.

ABSTRACT

The study had for objective the detection and typing of the dengue virus, in the vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* through the Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers. During the period of December of 2005 to December of 2006 8984 mosquitoes were collected, of these 827 they were *Aedes*, being 819 *Ae. aegypti* (414 females and 405 males) and 8 *Ae. albopictus* (7 females and 1 male), in 46 neighborhoods of the city of Manaus including all of the geographical areas of the city. The females were grouped in pools from 1 to 10 mosquitoes for microtubes, in agreement with the gender, it dates from collection, neighborhood and stocked to -70C in the same day of the collection, totaling 143 pools (138 of *Ae. aegypti* and 5 of *Ae. albopictus*). Those pools were macerated in PBS containing albumin, and a bracket of the softened was removed for inoculation in cell culture, and other bracket was used to accomplish the extraction of the viral RNA. Once extracted, RNA was submitted the reaction of reverse transcription following by the chain reaction of the polimerase (RT-PCR). The positive samples in RT-PCR were submitted the reaction of semi nested PCR and the products of this reaction were resolved in agarose gel to 1,5% with etídio bromide. Of the 143 analyzed pools, 114 (111 of *Ae. aegypti* and 3 of *Ae. albopictus*) they were positive for DENV 3, just a pool was shown positive for two sorotipos, DENV 1 and DENV 3. The prevalence pools *Ae. aegypti* infected with DENV 3 in the city of Manaus was of 53%, being larger in the areas Center-west (70%), South (60%) and West (53%), and smaller in the area East (23%). This is the first report of the detection of DENV 3 in field-caught *Ae. albopictus* naturally infected in Brazil. The monitoring of the circulation viral in mosquitoes with the use of the technique of RT-PCR allows the previous knowledge of the levels of spread viral in certain areas contributing to determine the time and place to apply the prevention measures and control.

Key words: dengue virus, RT-PCR, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do Genoma dos <i>Flavivirus</i>	17
Figura 2	Estrutura do vírus dengue.....	18
Figura 3	Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> em hematofagia.....	19
Figura 4	Fêmea de <i>Aedes albopictus</i> durante repasto sanguíneo.....	21
Figura 5	Produto da RT-PCR em gel de agarose.....	44
Figura 6	Identificação dos bairros e zonas do município de Manaus.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Quantitativo dos espécimes coletados no período de Dezembro/2005 a Dezembro/2006 na cidade de Manaus.....	42
Gráfico 2	Distribuição de mosquitos do gênero <i>Aedes</i> capturados na cidade de Manaus durante o período de Dezembro/2005 a Dezembro/2006.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para identificação dos vírus dengue e seus sorotipos....	40
Tabela 2	Resultados da RT-PCR dos <i>pools</i> de mosquitos.....	44
Tabela 3	Prevalência de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> infectados por zona geográfica da cidade de Manaus- AM.....	46
Tabela 4	Total de amostras de <i>Ae. albopictus</i> por zona da cidade de Manaus.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
μM	Micromol
AM	Amazonas
DENV	Vírus dengue
FD	Febre do Dengue Clássica
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas
KCl	Cloreto de Potássio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
°C	Graus Celcius
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pM	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição Reversa
SCD	Síndrome de choque por dengue
TBE	Tris Borato Etilenodiaminotetracético
U	Unidade
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Aspectos Gerais.....	15
1.2. Arbovírus.....	16
1.3. Vírus Dengue.....	17
1.4. Vetor e Transmissão do Vírus Dengue.....	18
1.4.1 <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	18
1.4.2 <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894).....	20
1.5. Manifestações Clínicas.....	22
1.5.1 Febre do Dengue Clássica.....	23
1.5.2 Febre Hemorrágica da Dengue.....	23
1.6. Diagnóstico da dengue.....	25
1.7. Histórico da Dengue.....	26
1.8. Dengue no Brasil.....	28
1.9. Dengue em Manaus.....	30
1.10. Prevenção e Controle.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Geral.....	33
2.2. Específicos.....	33
3. METODOLOGIA.....	34
3.1. Modelo de Estudo.....	34
3.2. Universo de Estudo.....	34
3.2.1. Amostras.....	34
3.2.2. Descrição da área de estudo.....	34
3.3. Coleta.....	36
3.4. Procedimentos Laboratoriais.....	37
3.4.1. Preparação dos Espécimes	37
3.4.2. Isolamento Viral.....	37
3.4.3. Extração do Genoma RNA Viral.....	38
3.4.4. Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase – RT- PCR	39
3.4.5. Reação de Semi <i>Nested</i> -PCR.....	39
3.4.6. Detecção do Produto Amplificado.....	40

3.5. Análise dos Resultados.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Coleta.....	42
4.2. Detecção do vírus dengue em amostras Aedes ssp. Por meio da RT-PCR.....	43
4.3. Isolamento do vírus dengue em cultura de células C6/36.....	47
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

A dengue é considerada a arbovirose mais freqüente em todo o mundo, constituindo causa importante de morbidade e mortalidade (SAMUEL; TYAGI, 2006). Estima-se que 2,5 a 3,0 bilhões de pessoas residam em áreas onde existe transmissão dos vírus da dengue e que, a cada ano, ocorram 50 milhões de infecções com 500.000 casos de dengue hemorrágica e 12.000 mortes em todo o mundo, fazendo dessa doença um problema importante de saúde pública (BRICKS, 2004). A dengue ocorre em regiões tropicais e subtropicais, predominantemente em áreas urbanas, suburbanas e agora em áreas rurais também (CHATURVEDI, 2006).

Os vírus da dengue pertencem ao gênero *Flavivirus*, família Flaviridae e são transmitidos aos humanos por espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor (GUBLER, 1998).

A progressão da dengue depende de condições ecológicas e sócio-ambientais que facilitam a dispersão do vetor (CÂMARA et al., 2007). O processo de urbanização desordenado produzindo regiões com alta densidade demográfica com graves deficiências no abastecimento de água, tratamento de esgoto inexistente ou inadequado, ausência de destino adequado do lixo, assim como a facilidade de transportes, intensas relações comerciais entre regiões e a falência dos programas de controle dos mosquitos favorecem o aumento da transmissão da dengue (PASSOS et al, 2004).

1.2.Arbovírus

O termo arbovírus deriva da expressão inglesa “ARthropod BORne VIRUS”, e é utilizado para designar vírus que são mantidos na natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos ou de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode através da via transovariana (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997). O homem, os primatas não-humanos e mosquitos do gênero *Aedes* são os hospedeiros naturais do vírus dengue, sendo o homem o único a desenvolver a forma clínica da doença (MIAGOSTOVICH, 1999).

Os arbovírus são classificados de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas. Com base em suas propriedades físico-químicas, a maioria dos arbovírus registrados está distribuída em cinco famílias: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae e Reoviridae. Vale ressaltar, no entanto, que nem todos os membros das citadas famílias são necessariamente arbovírus (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997).

A família Flaviviridae possui 70 membros, sendo a maioria pertencente ao gênero *Flavivirus* que inclui 68 espécies em 8 grupos sorologicamente relacionados (4 transmitidos por mosquitos, 2 por carrapatos e 2 não têm sido associados com vetor artrópode). Os vírus transmitidos por mosquitos incluem alguns de grande importância epidemiológica, como febre amarela (FA), encefalite de St. Louis (SLE), Rocio (ROC) e o vírus dengue (DEN), todos capazes de determinar epidemias explosivas (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2000).

1.3. Vírus Dengue

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Compreende 4 sorotipos com propriedades antigênicas diferentes denominados vírus DEN 1, DEN 2, DEN 3 e DEN 4 (GUBLER, 1998).

Os vírus dengue, bem como todos os *Flavivirus*, são esféricos, envelopados, com aproximadamente 40-50 nm de diâmetro. O genoma é constituído por um RNA de fita simples, com cerca de 11 kb, possuindo dez genes que se apresentam na seguinte ordem: 5' – C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5- 3'. Os genes estão contidos em “uma open reading frame”, a translação desta, resulta em um poliproteína que libera após clivagens, três proteínas estruturais (E, M e C) e sete não estruturais (NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5) (Figura 1) (SHU; HUANG, 2004; MIAGOSTOVICH, 1999).

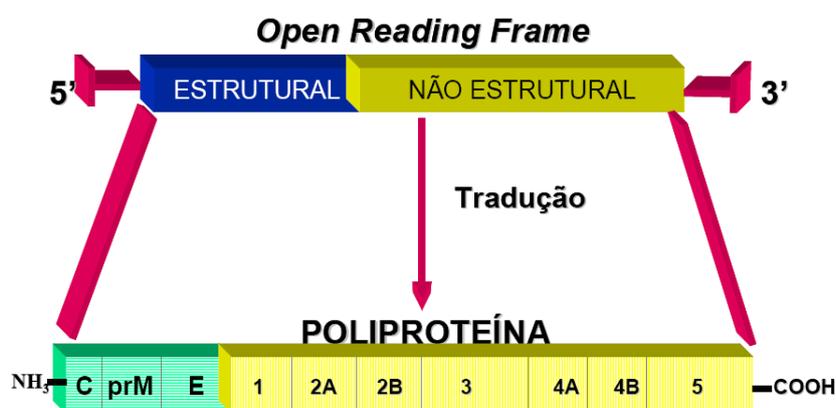


Figura 1: Esquema do genoma dos Flavivírus.
Fonte: BATISTA, 2007

A proteína M é resultante da clivagem de prM e está associada à membrana, a proteína C é a proteína que forma o nucleocapsídeo e a proteína E, constitui o envelope viral (Figura 2) (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

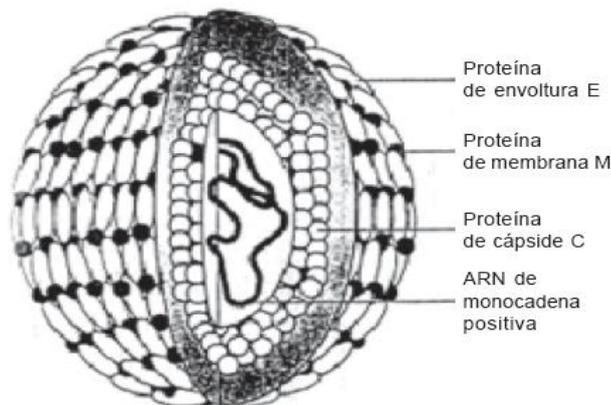


Figura 2: Estrutura do vírus dengue
 Fonte: CABEZAS et al., 2005

1.4.Vetor e Transmissão do Vírus Dengue

A transmissão dos vírus dengue envolve mosquitos do gênero *Aedes*, que se infectam após picarem indivíduos virêmicos e transferem, pela picada, os vírus ao homem susceptível, determinando, desta forma, o ciclo de transmissão (WHO, 1997). Nas Américas, o *Aedes aegypti* é o principal vetor, visto que o *Aedes albopictus*, vetor secundário na Ásia e no Pacífico, até o momento não tem sido implicado na transmissão dos vírus dengue no continente (TEIXEIRA et al., 1999).

1.4.1 *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762)

O *Aedes aegypti* (Figura3) é um inseto da ordem Diptera pertencente à família Culicidae. Esta espécie se originou no norte da África e se espalhou para a região mediterrânea da Europa, de onde, através de atividades comerciais e tráfico de escravos se espalhou para o resto do mundo (FORATTINI; BRITO, 2003). É um mosquito de hábitos domésticos que pica durante o dia e tem preferência acentuada por sangue humano (TAUIL, 2001). Esta espécie está adaptada a se reproduzir nos ambientes

doméstico e peridoméstico, realiza a postura dos seus ovos na água ou mais comumente, nas paredes úmidas de depósitos artificiais de água, tais como pneus, latas, tanques, barris, tonéis, caixas-d'água, vasos de plantas aquáticas, ou de reservatórios naturais, como ocos de bambus, ocos de árvores e de pedras (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).



Figura 3: Fêmea de *Aedes aegypti* em hematofagia
Fonte: www1.odn.ne.jp/.../images/t-Aedes_albopictus.gif

Em condições normais os ovos se desenvolvem, amadurecem e, após imersão na água, eclodem, porém, em condições adversas como baixas temperaturas e dessecação, o embrião entra no estado da diapausa, adiando a eclosão. Esse estado pode se prolongar por seis meses ou mais, até que ocorra o contato com a água e ocorra a eclosão do ovo (FORATTINI, 2002). Essa característica proporcionou a disseminação desse mosquito por amplas áreas geográficas, por meio do transporte de ovos em vários tipos de materiais. Essa é a chamada dispersão passiva, que pode acontecer por qualquer meio de transporte aéreo, marítimo ou terrestre (FORATTINI, 2002)

O tempo transcorrido entre a eclosão do ovo e a forma adulta, em condições favoráveis varia em torno de 10 dias. O período de vida do mosquito é de poucas semanas, podendo chegar a 45 dias. (PONTES; RUFFINO-NETO, 1994).

A maioria das fêmeas de culicídeos, necessita de pelo menos um repasto sanguíneo para maturar seus ovos. Entretanto, *Ae. aegypti*, mais do que qualquer outra espécie, alimenta-se mais de uma vez entre duas oviposições seguidas, especialmente quando a fêmea não está engurgitada. Essa característica tem grande importância epidemiológica porque aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e transmitir o vírus (BARATA et al., 2001). Não é raro membros da mesma família apresentarem a febre do dengue dentro de 24 a 36 horas, ao mesmo tempo, sugerindo que a infecção tenha sido causada por um único mosquito infectado. Esse comportamento faz do *Ae. aegypti* um vetor eficiente em provocar epidemia (GUBLER, 1998).

O período de incubação do dengue no homem é de 3 a 15 dias, tendo um tempo médio em torno de 5 a 6 dias. O mosquito se torna infectado, ao realizar repasto sanguíneo em indivíduos infectados que se encontram no período de viremia. O período de incubação no mosquito é de 8 a 11 dias, momento a partir do qual se torna infectante, assim permanecendo pelo resto da vida (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997). Experimentos laboratoriais demonstram que o mosquito *Ae. aegypti* pode ser infectado concomitantemente por diferentes arbovírus e que é também capaz de transmiti-los simultaneamente (ARAÚJO et al., 2006).

1.4.2 *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)

O *Aedes albopictus* é um mosquito originário das florestas do sudeste asiático, daí a denominação “Tigre Asiático” (Figura 4). Durante muito tempo se acreditou estar sua distribuição restrita apenas a Ásia. Entretanto, este conhecimento se alterou a partir da década de 80, quando se assinalou sua presença em outros continentes. Em consequência do intenso comércio intercontinental de pneus por intermédio dos

transportes marítimos, disseminou-se para as Américas, sendo inicialmente encontrado nos Estados Unidos, em 1985, onde já esta presente em 25 estados (TEIXEIRA et al., 1999).



Figura 4: Fêmea de *Aedes albopictus* durante repasto sanguíneo
Fonte: www1.odn.ne.jp/.../images/t-Aedes_albopictus.gif

A primeira notificação da presença do *Ae.albopictus* no Brasil foi feita por Forattini (1986), em material coletado no Estado do Rio de Janeiro e sua expansão pelo país é crescente e acelerada, com apenas quatro estados livres da sua presença: Amapá, Acre, Piauí, e Sergipe, ou pelo menos sem notificação (SANTOS, 2003). No Estado do Amazonas, foi encontrado pela primeira vez em junho de 1996, especificamente nas imediações de Tabatinga, de onde foi eliminado temporariamente. Em 1997 esta espécie foi encontrada novamente em Tabatinga e no Distrito de Letícia. Atualmente, a dispersão de *Ae. albopictus* já atinge nove municípios do Amazonas, incluindo Manaus, cuja ocorrência foi registrada pela primeira vez em 2003 (FÉ et al., 2003).

A introdução desta espécie no país pode acarretar uma séria de problemas à saúde pública, uma vez que este mosquito é considerado vetor da dengue na Ásia e ilhas

do Pacífico (THENMOZHI et al., 2007). Em experimentos laboratoriais, o *Ae. albopictus* mostrou-se capaz de transmitir pelo menos 22 tipos de arboviroses, entre elas, dengue e febre amarela (GRATZ, 2004).

Um fator importante é a sua capacidade de transmitir o vírus verticalmente, através de ovos infectados, o que possibilita estabelecer novos focos de dengue com importação de materiais que contenham ovos infectados. Em 1995, o vírus dengue foi isolado em machos de *Ae. albopictus* provenientes do México sugerindo uma transmissão transovariana entre a espécie (IBANEZ-BERNAL et al., 1997).

Embora este culicídeo não esteja implicado na transmissão de dengue no Brasil, larvas de *Ae. albopictus* naturalmente infectadas foram encontradas na cidade de Campos Altos, Minas Gerais (SERUFO et al., 1993). Guedes (2006) relatou o encontro de fêmeas de *Ae. albopictus* naturalmente infectadas pelo DENV 1 no município de Moreno. Castro et al. (2004) demonstraram que a suscetibilidade oral ao DENV 2 e a capacidade de transmissão vertical exibidas por populações de *Ae. albopictus* do Brasil reforça a hipótese que esta espécie pode ter um papel fundamental na manutenção do vírus na natureza e podem ser uma ameaça aos programas de controle, podendo ter importância epidemiológica no ciclo de transmissão desta doença e outras arboviroses no continente americano.

1.5. Manifestações Clínicas

Após serem inoculados através da picada do mosquito, os vírus fazem uma primeira replicação em células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, bem como nos linfonodos locais. Seguindo a multiplicação, tem início a viremia, com conseqüente disseminação do vírus para todo o organismo. Os vírus podem circular livres, no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos. As células fagocitárias são o maior sítio de

replicação viral, uma vez que estes vírus têm tropismo por estas células (FIGUEIREDO, 1999).

Anticorpos obtidos durante infecção por um tipo de dengue, conferem imunidade contra o tipo infectante, pela vida inteira, também protegem de infecção pelos outros três tipos, porém, esta proteção é apenas parcial e temporária (WHO, 1997).

A maior parte das infecções pelo vírus dengue podem variar desde a forma assintomática, passando por uma síndrome febril caracterizada por febre indiferenciada, febre clássica do dengue (FD), até a febre hemorrágica do dengue (FHD), que pode apresentar-se com extravasamento do plasma, podendo levar ao choque hipovolêmico (síndrome do choque por dengue, SCD) (WHO, 1997).

1.5.1 Febre do Dengue Clássica

A forma clínica clássica se apresenta como uma enfermidade aguda febril que se autolimita em aproximadamente 4 a 5 dias. A doença começa abruptamente com febre alta, dor de cabeça forte, mialgia, artralgia, dor retro-orbital, prurido maculopapular, náusea, vômito e fraqueza. Alguns pacientes podem apresentar anorexia, alteração da sensação de gosto, e dor de garganta moderada. Em alguns casos pode-se observar sinais de sangramento cutâneo, sob a forma de petéquias ou equimoses e raramente podem ocorrer outros tipos de sangramento, como epistaxe, gengivorragia, hematêmese e hematúria. A infecção evolui de modo benigno, desaparecendo ao fim de poucos dias a uma semana (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; GUBLER, 1998).

1.5.2 Febre Hemorrágico da Dengue

Manifestações hemorrágicas em pacientes com febre do dengue não são incomuns e vão de um quadro moderado a severo, com complicações de sangramento tais como epistaxe, sangramento gengival, gastrintestinal, hematúria e hipermenorréia, em alguns casos também existem relatos de trombocitopenia (GUBLER, 1998; GUZMÁN; KOURI, 2002).

Dois aspectos laboratoriais caracteristicamente acompanham os quadros da FHD e a síndrome do choque por dengue (SCD), que são trombocitopenia e hemoconcentração, que resultam do extravasamento de plasma devido ao aumento da permeabilidade vascular. As plaquetas usualmente se encontram abaixo de 100.000/mL e o hematócrito costuma estar 20% aumentado nos casos em que não há hemorragia, e diminuído nos casos com hemorragia (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; GUZMÁN; KOURI, 2002).

A contagem de leucócitos oscila entre leucopenia e moderada linfocitose, freqüentemente marcada por linfócitos atípicos. Níveis de enzimas hepáticas podem estar elevados no soro, a elevação é normalmente moderada, mas em alguns pacientes, os níveis de aminotransferase de alanina (TGO) e aminotransferase de aspartato (TGP) alcança 500 a 1,000 U/Litro (GUBLER, 1998).

A Organização Mundial da Saúde classifica a FHD em 4 graus de acordo com a severidade da doença: grau I, II, III e IV (WHO, 1997).

Grau I: febre e sintomas inespecíficos; a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva e/ou a equimose fácil.

Grau II: presença de fenômenos hemorrágicos espontâneos.

Grau III: insuficiência circulatória manifesta por pulso fraco e rápido, redução da pressão de pulso a 20 mmH, hipotensão, pele pegajosa e fria, agitação.

Grau IV: choque profundo caracterizado por ausência de pulso e pressão arterial.

Os graus III e IV são classificados como síndrome do choque por dengue, enquanto todos os quatro o são como febre hemorrágica do dengue.

1.6. Diagnóstico da dengue

Como na maioria das enfermidades de etiologia viral, é necessária a confirmação laboratorial quando se suspeita de infecção pelo vírus dengue. No diagnóstico laboratorial pode-se lançar mão de métodos que detectam a presença do vírus, como o isolamento viral e testes moleculares ou métodos para determinação de anticorpos por meio de testes sorológicos (CABEZAS, 2005).

Existem quatro métodos utilizados para o isolamento viral do dengue são eles: inoculação intracerebral em camundongos recém nascidos, inoculação intratorácica de mosquitos adultos, inoculação em culturas de células de mamíferos ou de mosquitos (CABEZAS, 2005). A linhagem de células mais utilizadas no isolamento do vírus dengue é a C6/36 de larvas de *Ae. albopictus*. Depois de um período de 7 a 10 dias pós-inoculação, em cultura de células, a confirmação do isolamento e identificação viral pode ser feita por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais sorotipo-específicos e também por RT-PCR (SAMUEL; TYAGI, 2006). O isolamento viral é indispensável para os laboratórios interessados em estudos de virologia básica, de patogênese e epidemiologia molecular dos vírus dengue (SHU; HUANG, 2004).

Cinco testes sorológicos são usados para o diagnóstico de infecção pelo vírus dengue: inibição de hemaglutinação (HI), fixação de complemento (CF), teste de neutralização (NT), ensaio imunoenzimático para captura de IgM (MAC-ELISA) e

ensaio imunoenzimático indireto para determinação de IgG (ELISA) (DE PAULA; FONSECA, 2004).

O ELISA é hoje a técnica de escolha para o diagnóstico de dengue, devido a sua alta sensibilidade e facilidade de uso. O ELISA é utilizado para realizar captura de IgM na fase aguda da doença (IgM) e de IgG na fase de convalescença (DE PAULA; FONSECA, 2004).

Nos últimos anos, várias técnicas de diagnóstico molecular foram desenvolvidas e utilizadas para o diagnóstico de dengue. Estes métodos podem assumir um papel importante no diagnóstico de dengue, uma vez que são capazes de detectar os vírus dengue durante a fase aguda da doença, e às vezes durante a fase de convalescença (CABEZAS, 2005). Dentre os testes moleculares utilizados no diagnóstico da dengue estão a hibridização de ácido nucléico e a transcrição reversa seguida da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a RT-PCR é um método poderoso a ser usado para diagnóstico da dengue, mas ainda precisa ser melhor padronizado (CABEZAS, 2005; DE PAULA; FONSECA, 2004). A RT-PCR pode ser aplicada no diagnóstico de dengue a partir de soro, tecidos de casos fatais, *pool* de mosquitos e cultura de células infectadas (SAMUEL; TYAGI, 2006).

Trabalhos utilizando-se a técnica de RT-PCR já vêm sendo realizados em várias países com o objetivo de conhecer as taxas de infecção em vetores, monitorar a circulação dos sorotipos já existentes em determinadas áreas e a introdução de novos sorotipos (AHMAD et al., 1997; CHOW et al., 1998; KOW et al., 2001; CHUNG; PANG, 2002; TUKSINVARACHARN et al., 2004; URDANETA et al., 2005).

No Brasil o uso da RT-PCR em estudos de vigilância virológica utilizando amostras de mosquitos é recente, contudo alguns trabalhos já foram realizados

(LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2002; DEGALIER et al., 2003; PINHEIRO et al., 2005).

1.7.Histórico da Dengue

A dengue é uma doença muito antiga, os primeiros registros relatam epidemias nas Índias Ocidentais em 1635, em Jakarta e no Cairo em 1779 (GUBLER, 1998). Subseqüentemente, foram informados surtos de dengue na Filadélfia (1780), Zanzibar (1823 e 1870), Calcutá (1824, 1853, 1871, 1905), Índia Ocidental (1827), e Hong Kong (1901) (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Depois de segunda guerra mundial, padrões endêmicos novos de doença, acompanhado por uma incidência aumentada de complicações da dengue clássica (FHD e DSS), emergiram no sudeste da Ásia (HENCHAL; PUTNAK 1990).

Os primeiros casos de dengue hemorrágica descritos ocorreram em crianças em Manila nas Filipinas no ano de 1953 e na metade dos anos 70, a dengue hemorrágica já tinha se tornado a principal causa de hospitalização e morte entre crianças na região (GUBLER, 1998).

Nos anos 50, 60, e a maior parte dos anos 70 as epidemias de dengue eram raras na América porque o principal mosquito vetor, o *Ae. aegypti* havia sido erradicado da maioria dos países da América Central e do Sul. No entanto, a descontinuidade do Programa de Erradicação em meados dos anos 70, o que contribuiu para a reintrodução do vetor e ressurgência da dengue a partir da década de 70 (GUBLER, 1998).

Nas décadas de 80 e 90 continuaram a ocorrer epidemias nos países da América, sendo notificados os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue, no ano de 1981 em uma epidemia em Cuba, durante essa epidemia, foram hospitalizados 116.151

pacientes e ocorreram 158 óbitos, destes 101 foram em crianças. O vírus implicado foi o dengue sorotipo 2 (TEIXEIRA et al., 1999).

Três fatores foram implicados como responsáveis para o aumento da transmissão de vírus dengue nas Américas: o fracasso no controle do vetor *Ae. aegypti*, o aumento do tráfego aéreo entre os países e a criação de condições ecológicas em cidades americanas tropicais o que permitiu coexistência de múltiplos sorotipos de vírus dengue (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

1.8.Dengue no Brasil

Algumas evidências apontam para a ocorrência de epidemias de dengue no Brasil desde 1846, nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro. No entanto, as primeiras referências a casos de dengue na literatura médica datam de 1916, em São Paulo, e de 1923, em Niterói (TEIXEIRA et al, 1999).

A campanha brasileira de erradicação do *Ae. aegypti* começou com Emilio Ribas, em 1903, e Oswaldo Cruz, em 1904, com o propósito de combater a febre amarela. Após 1920, com a assistência e o suporte financeiro da Fundação Rockefeller, a campanha ganhou impulso nacional e culminou com a erradicação do mosquito no país. Provavelmente, esta é a razão para a ausência de surtos de dengue no Brasil entre 1923 e 1981 (FIGUEIREDO; FONSECA, 2005).

A primeira epidemia de dengue com confirmação laboratorial ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista, Estado de Roraima, com a ocorrência de 11 mil casos segundo estimativas, o que correspondeu a aproximadamente uma incidência de 22,6 %, e foram isolados os sorotipos DEN-1 e DEN-4. A propagação viral para o resto do país não se

deu a partir desse episódio pelo fato de o mesmo ter sido rapidamente controlado e porque o *Ae. aegypti* não estava ainda disperso no território brasileiro (TEIXEIRA et al., 1999; VIEIRA et al., 2007).

No ano de 1986, nova epidemia volta a ocorrer no Brasil, agora numa região de grande concentração populacional, com graves problemas de infra-estrutura urbana, densamente povoada e localizada no eixo de maior concentração de atividades econômicas, a região metropolitana do Rio de Janeiro, tendo sido isolado o DENV 1 (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

A partir daí ocorreu a disseminação do mesmo sorotipo viral para outros estados do país e foram registradas epidemias nos estados de Alagoas, Ceará, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

Em 1990 ocorreu um recrudescimento em grandes proporções, decorrente do aumento da circulação do DENV 1 e a introdução do DENV 2 no Rio de Janeiro, surgindo neste período a primeira epidemia de dengue hemorrágica no país (NOGUEIRA et al., 2000).

A circulação desses sorotipos nos anos seguintes ocasionou epidemias praticamente em todas as regiões, com exceção de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde se registrou apenas casos importados. Na região Norte, além do estado de Roraima, registraram-se surtos nos estados do Acre, Amapá, Pará, Rondônia, Tocantins e Amazônia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Em dezembro de 2000, o vírus dengue 3 foi isolado pela primeira vez no município de Nova Iguaçu, de um paciente com febre clássica do dengue, e iniciou-se então um período de co-circulação de Den 1, Den 2 e Den 3 no estado ocasionando uma das epidemias mais severas de dengue (NOGUEIRA et al., 2005). O sorotipo DENV 3

expandiu-se rapidamente e após dois anos do seu isolamento este foi detectado em 22 estados brasileiros (MIAGOSTOVICH et al., 2002).

A dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 estados brasileiros, distribuída por 3.794 municípios, sendo responsável por cerca de 60% das notificações das Américas. Atualmente os três sorotipos do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3) circulam simultaneamente em 24 estados brasileiros, contribuindo para a incidência das formas graves da doença (CÂMARA et al., 2007).

Em 2004 foram notificados com um total de 105.896 casos de dengue, com a confirmação de 60 casos de febre hemorrágica e dois óbitos nos Estados de Minas Gerais e Alagoas (MS, 2005). Em 2005 foram registrados 248.189 casos de dengue e em 2006 um total de 345.922 casos de dengue foram notificados, com confirmação de 628 casos de febre hemorrágica e 67 óbitos distribuídos nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (MS, 2006). No ano de 2007 foram registrados 536.519 casos suspeitos de dengue, 1.275 casos confirmados de dengue hemorrágica e a ocorrência de 136 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Em 2008 o Brasil sofreu outra epidemia, somente durante o período de janeiro a abril, foram registrados 230.829 casos suspeitos de dengue, com 1.069 casos confirmados de dengue hemorrágica e 77 óbitos resultando em uma taxa de letalidade para febre hemorrágica do dengue de 7,2% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

1.9.Dengue em Manaus

Os casos de dengue só começaram a ser notificados no estado do Amazonas a partir de 1998. A primeira epidemia de dengue no estado ocorreu em 1998, causada pelo sorotipo DENV 1 acometendo 13.886 indivíduos. A segunda aconteceu em 2001 com circulação dos sorotipos DENV 1 e DENV 2. Estas epidemias foram restritas a Manaus,

pois aproximadamente 50% da população do estado se concentraram na capital (BASTOS, 2004). A co-circulação de dois sorotipos na segunda epidemia mostrou que sucessivas infecções são responsáveis pelo aparecimento das formas clínicas mais severas da doença e foram então registrados os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue no município de Manaus (BASTOS, 2004).

Em 2002 foi isolado o DENV 3 de um paciente procedente da Bahia, a partir daí outros casos de DENV 3 foram diagnosticados por isolamento viral. O DENV 4 foi isolado pela primeira vez de casos autóctones em Manaus em 2008 (FIGUEIREDO, 2008)

Hoje os quatro sorotipos do vírus dengue (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4), co-circulam na cidade de Manaus.

1.10. Prevenção e Controle

Por se tratar de uma virose contra a qual não existe vacina e nem medicamentos eficazes, o único elo vulnerável da cadeia epidemiológica é o vetor (TAUIL, 2001).

Em 1996, foi criado o Programa de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa) cujas ações de prevenção estavam centradas quase que exclusivamente nas atividades de campo de combate ao vetor, com aplicação de inseticidas. O aumento de casos de dengue e a continuidade de epidemias por todo país, mostrou a pouca eficiência dessas estratégias. O Ministério da Saúde estabeleceu então o Plano Nacional de Controle da Dengue, este novo programa incorporou novos elementos como a mobilização social, a

participação comunitária e o fortalecimento da vigilância entomológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Apesar das medidas adotadas pelo governo, casos de dengue continuam sendo notificados demonstrando a complexidade epidemiológica da dengue. Um problema importante na estratégia de convivência com o *Aedes* está na dificuldade de estabelecer qual limiar de infestação abaixo do qual não ocorreria a transmissão do dengue, pelo menos em patamares epidêmicos, pois, tem-se observado que mesmo com Índice de Infestação Predial baixo (1 a 2%) acontecem as epidemias (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

Diante das dificuldades na luta contra o *Aedes*, Gubler (1989) tem proposto a utilização de um sistema de vigilância ativa envolvendo vigilância clínica, entomológica e epidemiológica propriamente dita, o citado autor ainda defende que é primordial que esta vigilância seja realizada durante os períodos inter-epidêmicos ou de transmissão esporádica e não quando os processos epidêmicos já estejam instalados.

Atualmente a vigilância virológica no mosquito vetor é utilizada, e pode servir como advertência para os sistemas de monitoramento de surtos de dengue prevenindo epidemias (CHOW et al., 1998; SAMUEL; TYAGI, 2006). De acordo com Samuel; Tyagi (2006), o uso de RT-PCR na vigilância virológica do vetor tem sido intensificado recentemente, e mosquitos infectados com o vírus dengue podem ser detectados seis semanas antes do começo de surtos de dengue podendo predizer uma epidemia.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a ocorrência do vírus dengue em mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* capturados em bairros da cidade de Manaus-AM.

2.2 Específicos

2.1 Determinar os sorotipos do dengue vírus (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4) que estejam em circulação nos vetores positivados.

2.2 Isolar o vírus dengue a partir dos vetores capturados.

3. METODOLOGIA

3.1. Modelo de Estudo

Realizou-se um estudo longitudinal com duração de 12 meses para identificar o vírus dengue dentro de vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em circulação na cidade de Manaus.

3.2. Universo de Estudo

3.2.1. Amostras

Durante o período de dezembro de 2005 a dezembro de 2006 foram coletados para a pesquisa um total de 8.984 mosquitos, destes 827 eram pertenciam ao gênero *Aedes*, sendo 819 *Ae. aegypti* (414 fêmeas e 405 machos) e 8 *Ae. albopictus*.(7 fêmeas e 1 macho). Para o estudo foram analisadas somente as fêmeas de *Aedes*.

3.2.2 Descrição da área de estudo

Manaus é a capital do Amazonas e possui em torno de 1,7 milhão de habitantes. Sua atual divisão administrativa foi instituída pelo Decreto n.º 2.924, de 7 de agosto de 1995, publicado no Diário Oficial do Estado do Amazonas de 10/08/1995. Com este decreto, os 126 aglomerados urbanos foram agrupados e transformados em bairros

distribuídos em seis zonas: Sul, Centro-Sul, Oeste, Centro-Oeste, Leste e Norte (Manaus, 1996).

O agrupamento dos bairros em zonas não se deu aleatoriamente e sim a partir de suas características e localização espacial, diferenças socioeconômicas dos habitantes e de infra-estrutura (Manaus, 1996). Abaixo segue algumas características de cada zona:

Zona Sul –Composta por grandes centros de comércio e de serviços, sua principal característica é a abrangência do Centro. É a zona mais populosa e heterogênea em nível de renda, porém, possui aglomerados às margens dos igarapés que são carentes de saneamento básico.

Zona Centro-Sul – apresenta a melhor infra-estrutura urbana e equipamentos urbanos. A posição geográfica estratégica e o fácil acesso tornam essa área um ponto de convergência importante no que se refere a comércio e serviços, consolidando a descentralização de vários seguimentos da área central da cidade. Possui *shopping*, agencias bancarias, supermercados, redes de televisão, estádios de futebol.

Zona Oeste – é caracterizada pela ocupação espontânea, com exceção dos bairros Ponta Negra e Tarumã, considerados bairros nobres por suas paisagens e potencial turístico, possui grande extensão desocupada, principalmente no Tarumã, maior bairro da cidade. Outro bairro característico desta zona é o São Jorge, compreendendo uma grande área do Exército, possui ruas estreitas e acidentadas, mas com melhor estrutura que a zona Leste.

Zona Centro-Oeste – caracterizada pela ocupação em conjuntos habitacionais, organização espacial, poucos problemas de infra-estrutura. Esta região é importante zona de convergência para o sistema de saúde.

Zona Leste – caracterizada por invasões, é a zona mais pobre da cidade. Possui graves problemas de infra-estrutura que se somam a pobreza da população. O rápido

crescimento urbano dificulta o planejamento de do sistema de transporte coletivo, coleta de lixo, segurança pública.

Zona Norte – compreende aglomerados implantados através de invasões, loteamentos clandestinos e o maior conjunto habitacional da cidade (Cidade Nova), parte da população possui infra-estrutura urbana, porém as áreas invadidas apresentam problemas urbanos graves.

3.3. Coleta

Os mosquitos adultos foram coletados pela manhã e/ou à tarde em 46 bairros da cidade de Manaus abrangendo todas as zonas geográficas da cidade de Manaus. As coletas foram realizadas de maneira aleatória, independente destes bairros terem apresentado ou não, registro de dengue por seus moradores.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), na pessoa da Dra. Maria das Graças Barbosa. Para a captura dos mosquitos foi utilizado um tubo elétrico de aspiração, o qual era constituído por um tubo de polietileno de aproximadamente 1 m de comprimento, ligado a uma bateria que provocava um fluxo de ar que puxava os mosquitos para seu interior.

As coletas foram realizadas na área peridomiciliar e dentro das casas, em todos os cômodos do imóvel, com autorização prévia do morador. A seguir, os mosquitos coletados eram anestesiados com clorofórmio, transferidos para copos parafinados e acondicionados em uma caixa de isopor com gelo para transporte ao laboratório. No laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) os espécimes foram identificados, utilizando-se a chave de identificação de Forattini

(2002). Os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram agrupados em número de até 10 espécimes por microtubos (*pool*), de acordo com o gênero, data de coleta, bairro e em seguida foram estocados a -70°C .

A partir desses *pools* foram preparados inóculos que foram utilizados para isolamento em cultura de células C6/36 e para detecção de vírus pela técnica de RT-PCR.

3.4 Procedimentos Laboratoriais

3.4.1 Preparação dos Espécimes

Os *pools* foram macerados com graal e pistilo de vidro em tampão de salina fosfato pH 7,4 (PBS), contendo albumina bovina. Uma alíquota do macerado foi utilizada para inóculo em cultura de célula, outra alíquota foi utilizada para extração do RNA viral, o restante do macerado foi estocado a -70°C .

3.4.2 Isolamento Viral

Para o isolamento viral foram utilizadas células de larvas de mosquitos *Ae. albopictus*, clone C6/36. As células foram cultivadas em tubos estéreis, em meio de cultura Leibowitz – L15, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de solução de triptose fosfato, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina. Os tubos foram mantidos em atmosfera úmida, até formarem monocamadas confluentes que estavam então aptas a serem infectadas. Como inóculo foi utilizado 50 μL do *pool* de mosquitos previamente macerados e tratados com

uma solução de penicilina-estreptomicina. Os tubos com os inóculos foram incubados em estufa a 28°C. A monocamada de células era examinada diariamente em microscópio invertido para visualização quanto à produção de efeito citopático. As culturas que apresentaram efeito citopático foram submetidas a extração do genoma viral e RT-PCR para confirmação do isolamento e identificação do sorotipo viral.

3.4.3. Extração do Genoma Viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir do fluído de cultura de células infectadas que apresentaram efeito citopático ou diretamente do *pool* de mosquitos. Utilizou-se para extração o Trizol, método baseado na utilização de solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Life Technologies, USA). Homogenizou-se de 750 µL da amostra de *pool* de mosquitos ou fluído de cultura de células com 500 µL de Trizol. A mistura foi agitada vigorosamente em *vortex* e logo em seguida incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo foram adicionou-se 150 µL de clorofórmio, e a mistura foi agitou-se manualmente por 15 segundos e incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugou-se a 12.000 g, por 15 minutos a 4°C. Recolheu-se a fase aquosa transparente superior em um outro microtubo de 1,5 mL. O RNA foi precipitado com 380 µL de isopropanol e a amostra foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo após a solução foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C.

Desprezou-se o sobrenadante cuidadosamente, e o precipitado foi lavado com 750 µL de etanol gelado a 75%, em seguida centrifugou-se a 14.000 g por 5 minutos e o excesso de etanol retirado. O RNA precipitado foi seco e ressuspenso em 50 µL de

solução de água livre de RNase e DNase e estocado a -70°C até o momento do processamento.

3.4.4. Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase – RT-PCR

Uma vez extraído, o RNA viral foi submetido a técnica de RT-PCR, seguindo o protocolo de Lanciotti et al. (1992). Em um primeiro ciclo da PCR foi usado o par de *primer* consenso que amplifica um fragmento de 511 pb, correspondente a confluência dos genes C/prM (Tabela 1). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 100 μL contendo os seguintes componentes: 8 μL do RNA extraído, 50 mM KCl, 10 mM de Tris mM (pH 8.5), 1,5 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5mM de dithiothreitol, 50 pmol de cada *primer* (D1 e D2), 2,5 unidade da enzima RT e 2,5 unidade da enzima ampliTaQ polimerase e água livre de DNase e RNase para completar o volume.

A mistura foi amplificada em um termociclador programado para 1 ciclo 42°C por 1h; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos; 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo final a 72°C por 10 minutos.

Em seguida o produto desta RT-PCR foi submetido a reação de *Semi-Nested*.

3.4.5. Reação de *Semi Nested*-PCR

A segunda reação foi realizada com *primers* específicos para cada sorotipo viral (TS1, TS2, TS3 e TS4) que amplificam fragmentos de 489 pb, 119 pb, 290 pb e 392 pb para os sorotipos DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4, respectivamente (Tabela 1). As reações de Semi-Nested foram realizadas em um volume final de 100 µL, usando 10 µL do produto da primeira PCR diluída em água livre de DNase e RNase na proporção de 1:100. A mistura de reação foi a mesma da primeira PCR, com exceção do *primer* D2 que foi substituído pelos *primers* tipo específico de cada sorotipo de dengue, TS1, TS2, TS3 e TS4 (Tabela 1), e o dithiothreitol e a enzima da RT foram retirados nesta segunda amplificação. As amostras foram colocadas em termociclador com as seguintes condições 20 ciclos a 94⁰C por 30 segundos, 55⁰C por 1 minuto, seguido de 72⁰C por 2 minutos e um ciclo final a 72⁰C por 10 minutos.

Tabela 1

Primers utilizados para identificação dos vírus dengue e seus sorotipos.

Primers	Seqüência	Tamanho do Amplicon
D1	5' – TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG– 3'	511 pb
D2	5' – TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC – 3'	511 pb
TS1	5' – CGTCTCAGTGATCCGGGGG – 3'	482 pb
TS2	5' – CGCCACAAGGGCCATGAACAG – 3'	119 pb
TS3	5' – TAACATCATCATGAGACAGAGC – 3'	290 pb
TS4	5' – CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA – 3'	392 pb

3.4.6 Detecção do produto amplificado

Foi retirado 8 μL do produto amplificado e adicionado 2 μL de tampão de corrida com azul de bromofenol e glicerina. Utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pares de bases. A eletroforese foi realizada em gel de agarose na concentração de 1,5 % utilizando tampão TBE 1X, com voltagem de 90 a 100 V. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, a visualização foi feita em um transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital.

3.5 Análise dos resultados

Utilizou-se o aplicativo Microsoft Excel para a construção do banco de dados e para as representações gráficas. As análises dos dados foram realizadas com descrição estatística simples como prevalência.

Para estimar a prevalência de infecção de mosquitos do gênero *Aedes* spp. Nas zonas geográficas durante o período de Dezembro/2005 a Dezembro/2006 foi usado o software *Pool Screen* (KATHOLI et al., 1995).¹

Para comparar as taxas de infecção viral nas espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi usado o cálculo de taxa de infecção mínima (MIR - Minimum Infection Rate). Este índice é calculado dividindo-se o número de *pools* infectados por espécie pelo número total de mosquitos testados para cada espécie, multiplicado por 1.000 (CHOW et al., 1998).

4. RESULTADOS

4.1 Coleta

Durante o período de Dezembro/2005 a Dezembro/2006 foram coletados 8984 mosquitos em 46 bairros da cidade de Manaus, 8157 (91%) pertenciam a outros gêneros e 827 (9%) pertenciam ao gênero *Aedes* (gráfico 1).

Dos mosquitos do gênero *Aedes* 819 eram *Ae. aegypti* (414 fêmeas e 405 machos) e 8 *Ae. albopictus* (7 fêmeas e 1 macho) (gráfico 2).

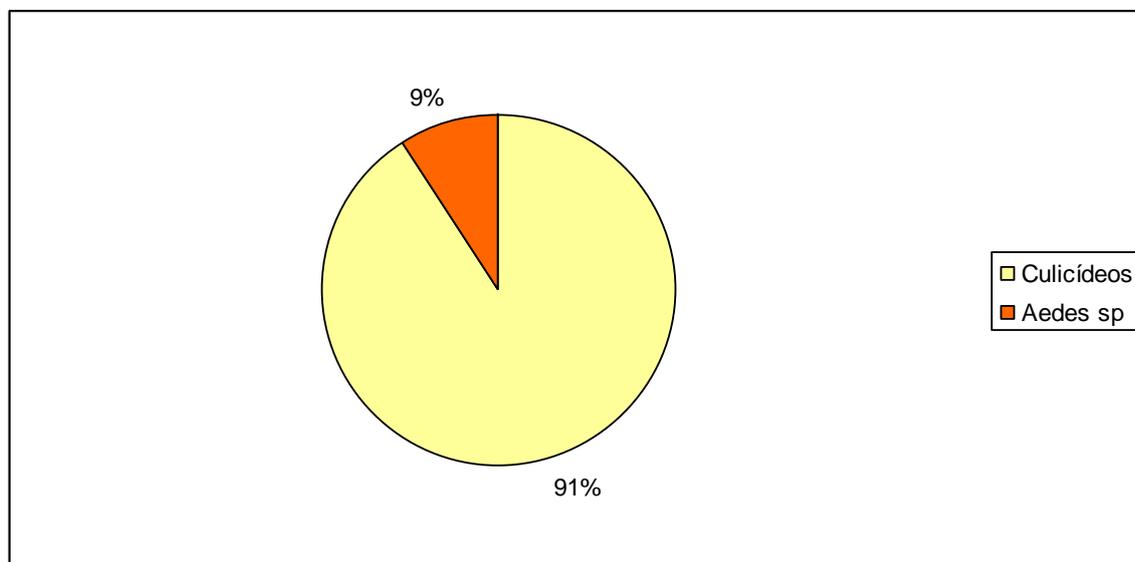


Gráfico 1. Quantitativo dos espécimes coletados no período de Dezembro/2005 a Dezembro/2006 na cidade de Manaus.

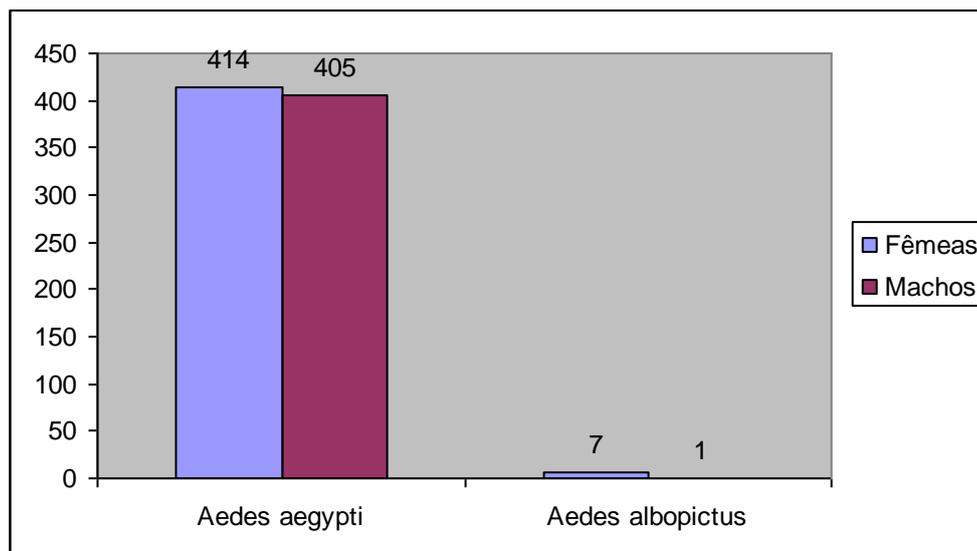


Gráfico 2: Distribuição de mosquitos do gênero *Aedes* capturados na cidade de Manaus durante o período de Dezembro de 2005 a Dezembro de 2006.

4.2 Detecção do vírus dengue em amostras de *Aedes spp.* por meio da RT-PCR.

Um total de 414 espécimes de *Ae. aegypti* perfazendo 138 *pools* e um total de 7 *Ae. albopictus* perfazendo 5 *pools* foram testados pela técnica de RT-PCR. Dentre as amostras de *Ae. aegypti* analisadas foram identificados 111 *pools* positivos, sendo que todos foram positivos para DENV 3, gerando uma positividade de 80% (Tabela 2). Apenas um *pool* foi positivo tanto para DENV 2 como para DENV 3. Dentre as amostras de *Ae. albopictus* analisadas, 3 *pools* foram positivos para presença do vírus dengue sorotipo 3, gerando uma positividade de 60% (Tabela 2).

Na figura 5 pode-se observar as amostras de DNA submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 1%. A banda de 119 pb corresponde ao DENV 2 e a banda de 290 pares de bases corresponde ao DENV 3.

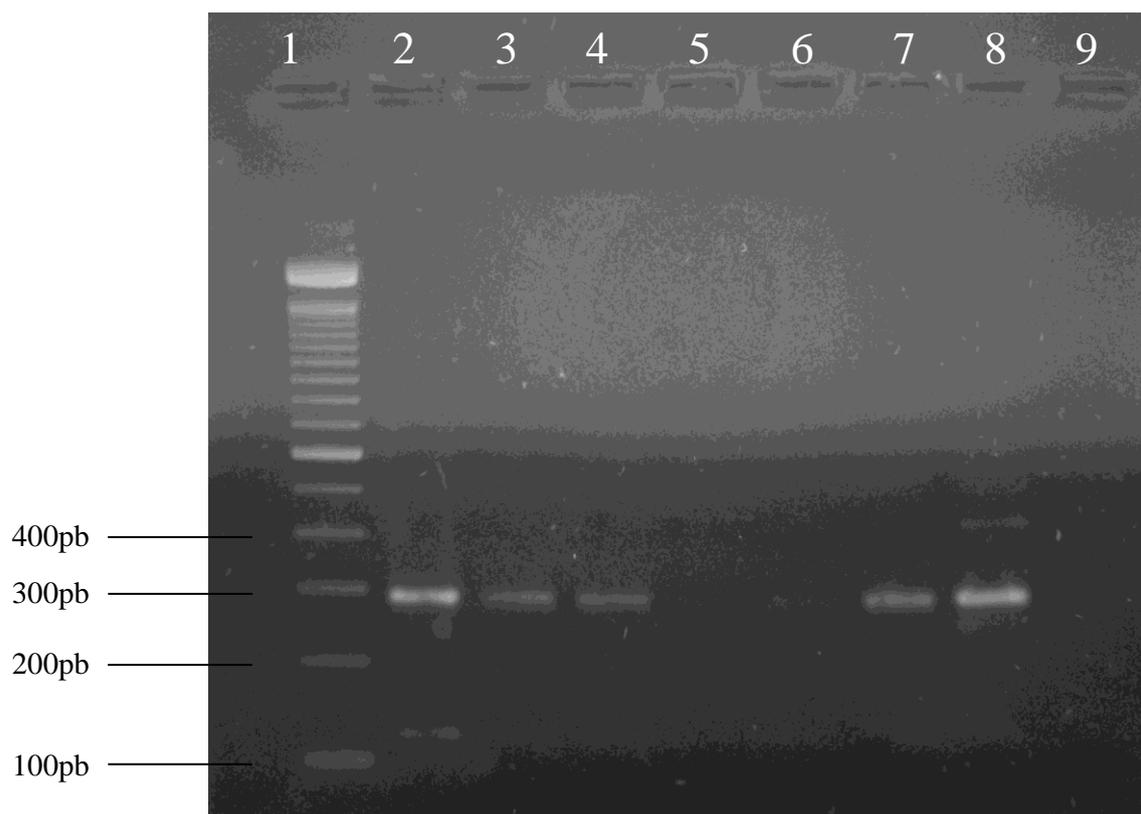


Figura 5: Produto da RT-PCR em gel de agarose.

Canal 1: Peso Molecular 100 pb. Canal 2: DENV 2 e DENV3. Canais 3, 4, 7: DENV 3. Canais 5 e 6: Negativos. Canal 8: Controle Positivo DENV 3. Canal 9: Controle Negativo.

Tabela 2

Resultados da RT-PCR dos *pools* de mosquitos.

Espécie	Nº de <i>pools</i> processados	Nº total mosquitos nos <i>pools</i>	Nº (%) de <i>pools</i> positivos	Prevalência % (IC)	DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4
<i>Ae. aegypti</i>	138	414	111(80%)	53% (41,2-65,0)	0	1	111	0
<i>Ae. albopictus</i>	5	7	3 (60%)	50% (62,3-96,0)			3	
Total	143	421	114			1	114	

Mosquitos *Ae. aegypti* foram encontrados em todos os 46 bairros onde foram realizadas as coletas, sendo detectados mosquitos positivos em 38 bairros. A localização

dos bairros onde foram encontrados mosquitos positivos para o DENV 3 pode ser visualizada na figura 6.

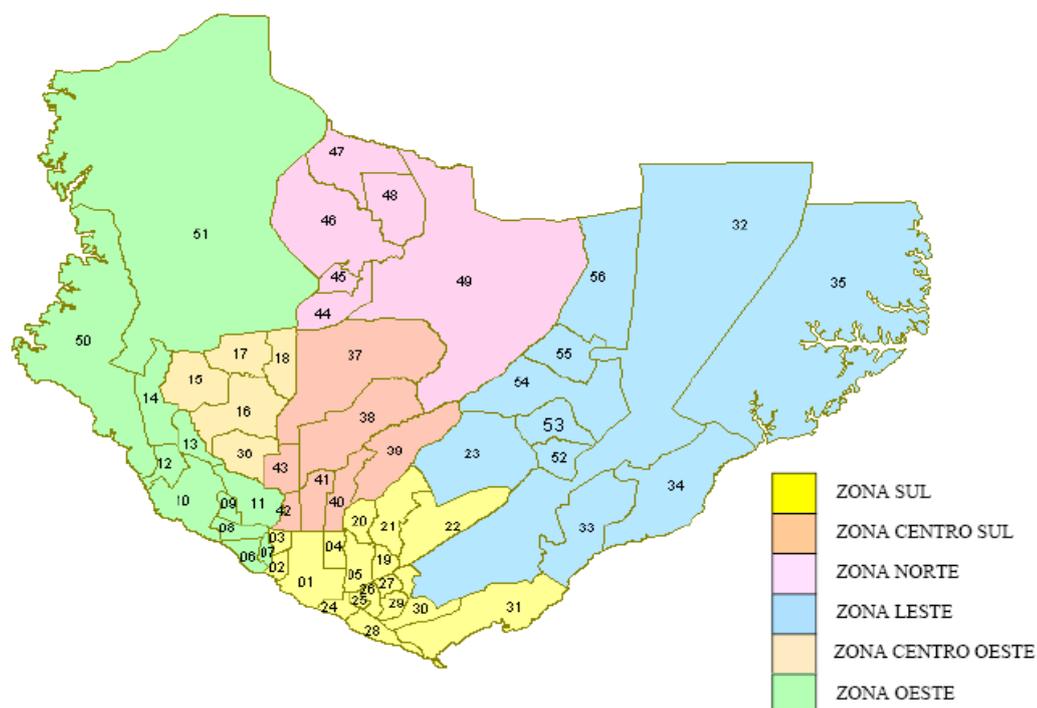


Figura 6: Identificação dos bairros e zonas do município de Manaus.

Legenda:

01- Centro	20- São Francisco	39- Aleixo
02- Nossa Senhora Aparecida *	21- Petrópolis	40- Adrianópolis
03- Presidente Vargas	22- Japiim***	41- Nossa S. das Graças
04- Praça 14 de Janeiro**	23- Coroado	42- São Geraldo
05- Cachoerinha	24- Educandos	43- Chapada
06- São Raimundo	25- Santa Luzia	44- Colônia Santo Antônio
07- Glória	26- Morro da Liberdade	45- Novo Israel
08- Santo Antônio	27- Betânia	46- Colônia Terra Nova
09- Vila da Prata	28- Colônia Oliveira Machado	47- Santa Etelvina
10- Compensa	29- São Lázaro	48- Monte das Oliveiras
11- São Jorge	30- Crespo	49- Cidade Nova
12- Santo agostinho	31- Vila Buriti	50- Ponta Negra
13- Nova Esperança	32- Distrito Industrial	51- Tarumã
14- Lírio do Vale	33- Mauzinho	52- Armando Mendes
15- Planalto	34- Colônia Antônio Aleixo	53- Zumbi dos Palmares
16- Alvorada	35- Puraquequara	54- São José Operário
17- Redenção	36- Dom Pedro I	55- Tancredo Neves

18- Bairro da Paz

37- Flores

56- Jorge Teixeira

19- Raiz

38- Parque 10

*Bairro onde não foi feita coleta.

**Bairro onde foi feita coleta e foram detectadas amostras positivas.

***Bairro onde foi feita coleta e não foram detectadas amostras positivas.

A prevalência de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com DENV 3 na cidade de Manaus foi de 53%, sendo maior nas zonas Centro-oeste (70%), Sul (60%) e Oeste (53%), e menor nas zonas Norte (30%) e Leste com (23%) (Tabela 3).

Tabela 3

Prevalência de mosquitos *Ae. aegypti* infectados por zona geográfica da cidade de Manaus- AM.

<i>Ae.aegypti</i>		
Zona de Coleta	Nº pools positivos (total)	Prevalência % (IC)
Norte	17 (23)	30% (23,5-62,7)
Sul	28 (31)	60% (47,0-92,6)
Leste	13 (21)	23% (14,2-45,1)
Oeste	12 (15)	53% (32,3-86,0)
Centro-Oeste	18 (20)	70% (46,0-96,0)
Centro-Sul	23 (28)	47% (32,4-75,4)
Total	111 (138)	-

As fêmeas de *Ae. albopictus* foram encontrados em 4 das 6 zonas de Manaus, a tabela 4 mostra o número de mosquitos coletados em cada zona, o número de *pools* testados e positivos para DENV 3. Mosquitos *Ae. albopictus* infectados foram encontrados nos seguintes bairros: Centro, Nossa Senhora das Graças e Planalto.

Tabela 4

Total de amostras de *Ae. albopictus* por zona da cidade de Manaus.

Zona	N ^o . de mosquitos	N ^o .de <i>pools</i> testados	N ^o . <i>pools</i> positivos
Sul	1	1	1
Oeste	2	1	0
Centro-Oeste	1	1	1
Centro-Sul	3	2	1
Total	7	5	3

A taxa de infecção mínima (MIR) calculada para as espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi de 268 e 428 por 1000 mosquitos analisados, respectivamente.

4.3 Isolamento do vírus dengue em cultura de células C6/36

Todos os 143 *pools* (138 *Ae. aegypti* e 5 *Ae. albopictus*) foram inoculados em cultura de célula C6/36, sendo que 12 *pools* de *Ae. aegypti* apresentaram suspeita de efeito citopático, destes apenas 11 foram positivos na RT-PCR confirmando o isolamento de DENV 3. Dos *pools* de *Ae. albopictus* 2 apresentaram efeito citopático, mas apenas um teve o isolamento de DENV 3 confirmados por RT-PCR.

5. DISCUSSÃO

A RT-PCR tem sido utilizada no diagnóstico de diversas doenças e, nos últimos anos revolucionou o diagnóstico de doenças infecciosas demonstrando ser bastante útil no diagnóstico da dengue. É uma técnica rápida simples e eficiente na identificação e caracterização de arbovírus em investigações epidemiológicas, permite a detecção em uma infinidade de amostras (soro, tecidos de casos fatais, cultura de células, larvas de mosquitos e *pools* de mosquitos adultos) (GUZMAN; KOURI, 2002; CABEZAS, 2005).

O presente estudo analisou 143 *pools* (138 de *Ae. aegypti* e 5 de *Ae. albopictus*) pela técnica de RT-PCR, para identificação dos sorotipos do vírus dengue circulantes na cidade de Manaus durante o período de Dezembro/2005 a Dezembro/2006. Foi encontrada uma positividade de 80% (111) nos *pools* de *Ae. aegypti* e 60% (3) nos *pools* de *Ae. albopictus* ambos para o sorotipo 3. Esse elevado percentual de infecção pelo DENV 3 demonstrou uma importante circulação desse sorotipo na cidade em populações naturais de mosquitos adultos no período de estudo.

Na Tailândia, Tuksinvaracharn et al. (2004) analisando 391 espécimes de *Ae. aegypti* e 9 *Ae. albopictus* encontrou positividade somente para DENV 3. No Rio de Janeiro, Lourenço de Oliveira et al., (2002) analisaram mosquitos *Aedes* para detecção dos vírus dengue, encontrando também positividade somente para o DENV 3. Em Manaus Pinheiro et al. (2005) analisaram 374 mosquitos *Ae. aegypti* no ano de 2003 para detecção de vírus dengue encontraram 18% de positividade para DENV 3, observou-se então, um aumento significativo nesta positividade, uma vez que o presente estudo realizado entre 2005-2006 encontrou uma positividade de 80% para este mesmo sorotipo.

De fato segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde em atividades de monitoramento da circulação viral por meio de sorologia demonstrou a predominância deste sorotipo em todas as regiões do país nos anos de 2006, 2007 e 2008. Figueiredo (2008) em estudo sorológico realizado durante o período de 2005 a 2007 na cidade de Manaus verificou 57,5 % de positividade para DENV 3.

Este aumento da positividade de mosquitos infectados nos permite concluir que a população de Manaus estava sob risco de sofrer epidemia ocasionada pelo DENV 3. A alta prevalência de mosquitos infectados (53%) se refletiu no aumento do número de casos de dengue nos anos subsequentes ao estudo. Em 2007 Manaus registrou 2.731 casos de dengue, e entre Janeiro e Abril de 2008 foram notificados 4.537 casos de dengue, caracterizando uma epidemia na cidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A ocorrência de mosquitos infectados foi observada em grande parte dos bairros que compõem as diferentes zonas da cidade de forma heterogênea. A prevalência de infecção nos mosquitos, ao longo do período estudado, variou de 23% na zona Leste, 70% na zona Centro-oeste, 60% na Sul e 53% na zona Oeste. Estudos sorológicos obtiveram distribuição semelhante, Bastos (2004), observou que a distribuição dos casos de dengue era menor na zona Leste (9%) e maior na zona Sul (25%) e Figueiredo (2008) observou uma maior positividade de casos de dengue nas zonas Centro-oeste, Sul e Oeste. Os dados destes estudos corroboram os resultados deste trabalho, uma vez que as zonas com maior prevalência de mosquitos infectados, são as zonas com mais casos de dengue notificados.

A prevalência de mosquitos infectados foi maior nas zonas cujas populações possuem nível socioeconômico mais elevado e os bairros apresentam melhor infraestrutura. Resultados semelhantes foram encontrados em inquéritos soro-epidemiológicos por Vasconcelos et al (1998) em Fortaleza-CE e Vasconcelos et al.,

(1999) em São Luiz-MA que identificaram maior soroprevalência de dengue na população com maior renda. Segundo estes autores, tais achados podem ser explicados em função do hábito das pessoas mais favorecidas em cultivar plantas aquáticas e o uso de materiais descartáveis. O uso excessivo de enlatados sem cuidado no seu descarte também poderia ser um fator que contribuiria para esta situação uma vez que estes objetos tendem a tornar-se criadouros de mosquitos.

Considerando o homem como principal hospedeiro no ciclo de transmissão urbano do vírus dengue, a detecção apenas do DENV 3 mostra que a maior parte da população de Manaus está imune aos vírus DENV 1 e DENV 2. Uma vez que estes sorotipos circularam na cidade em anos anteriores, e parte da população se infectou com esses sorotipos produzindo anticorpos contra estes tipos infectantes. Com a introdução do DENV 3, a população se encontrava susceptível a este sorotipo, o que pode ter facilitado a sua dispersão, e a maior facilidade de detectá-lo tanto em mosquitos como em humanos.

O conhecimento dos sorotipos circulantes numa localidade é fundamental, pois se sabe que alguns vírus causam manifestações clínicas mais severas, fato observado mais comumente em locais com circulação simultânea de diferentes sorotipos (BALMASEDA et al., 2006). Segundo Passos et al., (2004) indivíduos acometidos pelo DENV 3 apresentam sintomatologia mais grave, apresentando chance 6,07 vezes maior de apresentar choque em relação a indivíduos infectados com DENV 2, sugerindo maior virulência deste sorotipo, este fato nos permite concluir que a população de Manaus poderia vir a apresentar um maior número de casos graves da doença uma vez que todos os mosquitos infectados o estavam pelo DENV 3.

Os resultados mostram a ocorrência de infecção natural pelo DENV 3 nas populações de *Ae. albopictus* da cidade de Manaus. Este é o primeiro relato de

mosquitos adultos coletados do meio ambiente infectados com DENV 3 no Brasil. Uma vez que o homem é o único reservatório do vírus no ambiente urbano, é provável que as fêmeas infectadas tenham adquirido o vírus ao através de uma pessoa infectada.

Serufo et al. (1993) descreveram o primeiro encontro de exemplares de larvas de *Ae. albopictus* coletadas na natureza e infectados por DENV 1, nas Américas. Durante epidemia de dengue no estado de Minas Gerais, município de Campos Altos, confirmando a transmissão vertical de vírus dengue por essa espécie vetora. Em 2006 Guedes mostrou a ocorrência de mosquitos adultos naturalmente infectadas pelo DENV 1 no município de Moreno. Dessa forma, a crescente e acelerada expansão deste mosquito em território brasileiro, associada à sua competência vetorial já comprovada, pode torná-lo uma ameaça, podendo vir a desempenhar papel importante na transmissão do vírus dengue.

Diversos estudos apontam o monitoramento do vírus dengue em amostras de *Aedes* como uma das formas de se prevenir epidemias. Em Singapura, Chow et al. (1998) detectaram uma taxa de infecção mínima para de 57,6 e 50 mosquitos contaminados para cada 1000 mosquitos analisados para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente. Diallo et al. (2003) detectaram, numa situação de transmissão silenciosa do Dengue, uma taxa de infecção mínima de 2,74 mosquitos contaminados para cada 1000 analisados. Os dados aqui apresentados demonstram que a cidade de Manaus estava realmente em situação preocupante, uma vez que as taxas de infecções mínimas foram de 268 e 428 para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente.

A investigação das taxas de infecção em mosquitos fornece informações sobre os sorotipos circulantes em determinadas localidades, antes que a doença esteja sendo transmitida em níveis mais elevados, possibilitando a implementação de medidas

preventivas evitando epidemias. De acordo com Samuel; Tyagi (2006), mosquitos infectados podem ser detectados seis semanas antes do começo de surtos.

O monitoramento da circulação viral em vetores, com a técnica de RT-PCR apresenta-se como alternativa, permitindo identificar com antecedência e confiabilidade os níveis de disseminação do vírus, e se faz extremamente necessário na cidade de Manaus devido a introdução do novo sorotipo DENV 4, ajudando a determinar a época e os locais para aplicar as políticas públicas de controle.

6. CONCLUSÕES

- O diagnóstico de infecção vetorial dos mosquitos *Ae. aegypti* com a técnica de RT-PCR revelaram uma ampla circulação do DENV 3 em Manaus durante o período de Dezembro/2005 a Dezembro/2006, o que culminou em uma epidemia por este sorotipo no início do ano de 2008.
- O diagnóstico de infecção vetorial dos mosquitos *Ae. albopictus* com a técnica de RT-PCR revelaram a presença de mosquitos desta espécie infectados com DENV 3 na cidade de Manaus.
- Apesar da detecção do vírus dengue em mosquitos *Ae. albopictus* em Manaus, não é possível afirmar o envolvimento desta espécie no ciclo de transmissão local da doença.
- Em Manaus as zonas Centro-oeste, Sul e Oeste apresentaram maior prevalência de mosquitos *Ae. aegypti* infectados, sendo portanto as zonas com mais casos de dengue notificados .
- A técnica de RT-PCR permitiu identificar com antecedência e confiabilidade o sorotipo do vírus dengue circulante na cidade de Manaus, podendo portanto, ser utilizada como ferramenta para o monitoramento da circulação viral nos mosquitos vetores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, R.; ISMAIL, A.; SAAT, Z.; LIM, L. H. Detection of dengue virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adults and larvae. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 28, n. 1, p. 138-142, 1997.
- ARAÚJO, F. M. C.; NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; RAMALHO, I. L. C.; RORIZ, M. L. F. S.; MELO, M. E. L.; COELHO, I. C. B. Concurrent infection with dengue type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 925-928, 2006.
- BALMASEDA, A.; HAMMOND, S. N.; PÉREZ, L.; TELLEZ, Y.; SABORÍO, S. I.; MERCADO, J. C.; CUADRA, R.; ROCHA, J.; PÉREZ, M. A.; SILVA, S.; ROCHA, C.; HARRIS, E. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 3, p. 449-456, 2006.
- BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; CHIARAVALLI NETO, F.; GLASSER, C. M.; BARATA, J. M. S.; NATAL, D. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 237-242, 2001.
- BASTOS, M. S. Perfil soroepidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001). Dissertação de Mestrado, Manaus: Fundação Oswaldo Cruz, 2004.
- BATISTA, W. C. Mapeamento das arboviroses no Estado de Rondônia. Manaus: UFAM, 2007. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2007.
- BRICKS, L. F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria**, v. 26, n. 4, p. 268-81, 2004.
- CABEZAS, C. Dengue em el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica**, v. 22, n. 3, p. 212-228, 2005.
- CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-96, 2007.
- CASTRO, M. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Dengue Virus Detection by Using Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction in Saliva and Progeny of Experimentally Infected *Aedes albopictus* from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 809-814, 2004.
- CHATURVEDI, U. C. The curse of dengue. **Indian J. Med. Res**, v. 124, p. 467-70, 2006.

CHOW, V. T. K.; CHAN, Y. C.; YONG, R.; LEE, K. M.; LIM, L. K.; CHUNG, Y. K.; LAM-PHUA, S. G.; TAN, B. T. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **Am. J. Med. Hyg.**, v. 58, n. 5, p. 578-586, 1998.

CHUNG, Y. K.; PANG, F. Y. Dengue virus infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. **Trop Med Int Health**, v. 7, n. 4, p. 322-330, 2002.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 390-8, 2004.

DEGALIER, N.; TEIXEIRA, J. M. S.; SOARES, S. S.; PEREIRA, R. D.; PINTO, S. C. F.; CHAIB, A. J. M.; VASCONCELOS, P. F. C.; OLIVEIRA, E. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 386-387, 2003.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 5, n. 3, p. 259-265, 2002.

FÉ, N. F.; BARBOSA, M. G. V.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. F. Registro da ocorrência de *Aedes albopictus* em área urbana do município de Manaus, Amazonas. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 674-5, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina, Ribeirão Preto**, v., 32, p. 15-20, 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

FIGUEIREDO, R. M. P. ; NAVECA, F. G. ; BASTOS, M. S. ; MELO, M. N. ; VIANA, S. S. ; MOURAO, M. P. G. ; COSTA, C. A. ; FARIAS, I. P. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, vol. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.

FIGUEIREDO, R. M. P.; THATCHER, B. D.; LIMA, M. L.; A; ALMEIDA, T. C.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 476-79, 2004.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Vol. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.20, p. 244-245, 1986.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v.37, p. 676-677, 2003.

GOMES, A. C. *Aedes albopictus*: implicações vetoriais em área de ocorrência de febre amarela. In. _____. **Simpósio sobre dengue**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1999.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 18, p. 215-227, 2004.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. **Bull PAHO**, v. 23, p. 397-404, 1989.

GUEDES, D. R. D. Epidemiologia Molecular do *Aedes albopictus* (Díptera: Culicidae). Recife: Fiocruz, 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

GUSMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: uma atualização. **Coleção estudos da cidade**, n. 47, 2002.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

IBANEZ-BERNAL, S.; BRISENO, B.; MUTEBI, J. P.; ARGOT, E.; RODRIGUEZ, G.; MARTINEZ CAMPOS, C.; PAZ, R.; SAN ROMAN, P. F.; CONYER, R. T.; FLISSER, A. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa in Mexico. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 305-309, 1997.

KOW, C. Y.; KOON, L. L.; YIN, P. F. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. **J Med Entomol**, v. 38, n. 4, p. 475-479, 2001.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G.; VORNDAM, V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; HONÓRIO, N. A.; CASTRO, M. G.; SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; ALVES, J. C. R.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; NOGUEIRA, R. M. R. Dengue virus type 3 in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, 2002.

MANAUS. Legislação Urbanística. Atualização da lei n.º 1214/75 – Plano de desenvolvimento local integrado – PDLI. Instituto Municipal de Planejamento Urbano e Informática – IMPLAN, 1996.

MIAGOSTOVICH, M. P. ; DOS SANTOS, F. B. ; DE SIMONE, T. S. ; FILIPPIS, A. M. B. ; SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.35, n.8, 2002

MIAGOSTOVICH, M. P. Características dos vírus dengue e de suas replicações. In. GOMES, A. C. **Simpósio sobre dengue**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**, Brasília, jul. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim: Situação epidemiológica da dengue até Dezembro de 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/boletim_dengue_dez2006.pdf>. Acesso em 28 nov. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: Boletim da semana 37/2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim%20Semana%2040%202005.pdf>>. Acesso em 28 nov. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe epidemiológico da dengue, janeiro a novembro de 2007. Disponível em: <<http://congressoemfoco.ig.com.br/UserFiles/Image/MS.doc>>. Acesso em 28 nov. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe epidemiológico da dengue, janeiro a abril de 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_2803.pdf>. Acesso em 16 ago. 2008.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.

NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; SANTOS, F. B.; CUNHA, R. V.; COELHO, J. O.; SOUZA, L. J.; GUIMARÃES, F. R.; ARAÚJO, E. S. M.; SIMONE, T. S.; BARAN, M.; TEIXEIRA JR, G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, 2005.

PASSOS, M. N. P.; SANTOS, L. M. J. G.; PREIRA, M. R. R.; CASALI, C. G.; FORTES, B. P. M. D.; VALENCIA, L. I. O.; ALEXANDRE, A. J.; MEDRONHO, R. A. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 293-295, 2004.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P.; BARROS, P. M. S. S.; VASCONCELOS, P. F.C.; CRUZ, A. C. R. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 833-839, 2005.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian J. Med. Res**, v. 123, p. 615-628, 2006.

SANTOS, R. C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Revista de Saúde Pública**, v.37, p. 671-673, 2003.

SERUFO, J. C.; OCA, H. M.; TAVARES, V. A.; SOUZA, A. M.; ROSA, R. V.; JAMAL, M. C.; LEMOS, J. R.; OLIVEIRA, M. A.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 503-504, 1993.

SHU, P.; HUANG, J. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 642-650, 2004.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

THENMOZHI, V.; HIRIYAN, J. G.; TEWARI, S. C.; SAMUEL, P. P.; PARAMASIVAN, R.; RAJENDRAN, R.; MANI, T. R.; TYAGI, B. K. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a Southern Indian State. **J. Infect. Dis**, v. 60, p. 245-249, 2007.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; RODRIGUES, S. G. Dengue. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997.

TUKSINVARACHARN, R.; TANAYAPONG, P.; PONGRATTANAM, S.; HANSASUTA, P.; BHATTARAKOSOL, P.; SIRIYASATIEN, P. Prevalence of dengue virus in *Aedes* mosquitos during dry season by semi-nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (semi-nested RT-PCR). **J Med Assoc Thai**, v. 87, p. 129-133, 2004.

URDANETA, L.; HERRERA, F.; PERNALETE, M.; ZOGHBI, N.; RUBIO-PALIS, Y.; BARRIOS, R.; RIVERO, J.; COMACH, G.; JIMÉNEZ, M.; SALCEDO, M. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. **Infect Genet Evol**, v. 5, n. 2, p. 177-184, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C.; LIMA, J. W. O.; RAPOSO, M. L.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; AMORIM, S. M. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; MOURA, C. M. P.; FONSECA, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Inquérito

soro-epidemiológico na Ilha de São Luiz durante epidemia no Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 2, p. 171-179, 1999.

VASCONCELOS, P. F. C.; LIMA, J. W. O.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TIMBÓ, M. J.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; LIMA, H. R.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, p. 447-454, 1998.

VIEIRA, D. S.; HONDA, E. R.; PEREIRA, S. S.; BIFANO, S. G.; TADA, M. S.; BATISTA, W. C. Characterization of dengue vírus serotype 1 in epidemics in Porto Velho, Rondônia, in 2001-2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 268-271, 2007.

World Health Organization. **Dengue Haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control**. 2.ed. Geneva, 1997.