

The background of the cover features a stylized illustration of two Egyptian figures, a woman on the left and a man on the right, both wearing traditional attire and holding golden vessels. In the center, a large, detailed illustration of an Aedes aegypti mosquito is superimposed over the figures. The mosquito is shown from a dorsal view, with its wings spread and its segmented body clearly visible. The overall style is that of a scientific or educational publication.

ANA PAULA PESSOA VILELA

**MONITORAMENTO DO *Dengue virus*
CIRCULANTE EM LARVAS E
MOSQUITOS ADULTOS DE *Aedes
aegypti***

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Professora Dra. Erna Geessien Kroon
Co-Orientador: Professor Dr. Álvaro Eduardo Eiras

Belo Horizonte, 2007

Agradecimentos

Agradeço aos meus amados pais e irmã os valiosos valores aprendidos, à pessoa que me tornei e que ainda estou me tornando.

À minha segunda família do coração, que me adotou e contribuiu para que não me perdesse no caminho.

Aos amigos, mestres e colegas todos os ensinamentos, convivência e apoio.

Pela oportunidade e por terem acreditado em mim, estou e estarei sempre à disposição de Erna, Álvaro, João (meu velhinho amado!), Paulo, Cláudio, Angelita (minha conselheira!), Ildinha, Cida e Deza. Sempre grata!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	10
INTRODUÇÃO	11
1.FAMÍLIA <i>Flaviviridae</i>	11
2.GÊNERO <i>Flavivirus</i>	11
3.PARTÍCULA VIRAL E GENOMA	12
4.PROTEÍNAS VIRAIS	15
5.MULTIPLICAÇÃO VIRAL	16
6.TRANSMISSÃO DO <i>Dengue virus</i>	17
7.MULTIPLICAÇÃO DE <i>Dengue virus</i> NO VETOR.....	19
8.MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DENGUE	23
9.PATOGENESE VIRAL.....	24
10.EPIDEMIOLOGIA	26
11.DENGUE NO BRASIL.....	30
12.IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS.....	33
13.VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DA DENGUE	33
JUSTIFICATIVA	36
OBJETIVOS	37
1.OBJETIVO GERAL	37
2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
MATERIAL E MÉTODOS	38
1.INSTALAÇÃO DAS ARMADILHAS	38
2.EXTRAÇÃO DE RNA DE LARVAS DE MOSQUITOS E DE MOSQUITOS ADULTOS (<i>Boom et al, 1990</i>) E KIT COMERCIAL DE EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL QIAGEN.....	43
3.SÍNTESE DE <i>cDNA</i>	44
4.REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE - PCR	45
a.PCR “SEMI-NESTED”	45
b.FRACIONAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	46
c.PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	46
d.SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE DNA.....	47
RESULTADOS.....	48
1.COLETA DE MOSQUITOS E LARVAS DE <i>Ae. aegypti</i> NOS DIFERENTES MÉTODOS DE AMOSTRAGEM.....	48
2.PROCESSAMENTO DOS MOSQUITOS E LARVAS	48
3.DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR RT-PCR	52
a.PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA.....	52

<i>b. TESTE DE SENSIBILIDADE DA RT-PCR- “SEMI-NESTED”</i>	52
<i>c. DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENOMA VIRAL NAS AMOSTRAS DE MOSQUITOS E LARVAS ..</i>	56
<i>d. PURIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO PRODUTO OBTIDO POR RT-PCR RELATIVO À REGIÃO DE JUNÇÃO DOS GENES C-prM</i>	61
<i>4. MAPAS DE GEORREFERENCIAMENTO</i>	68
DISCUSSÃO	80
<i>1. COLETA DE MOSQUITOS E LARVAS DE Ae. aegypti EM DIFERENTES ARMADILHAS</i>	80
<i>2. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR RT-PCR</i>	81
<i>a. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA</i>	81
<i>b. TESTE DE SENSIBILIDADE DE DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL</i>	82
<i>3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DOS MOSQUITOS E LARVAS</i>	82
<i>4. PURIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DE JUNÇÃO DOS GENES C-prM</i>	84
<i>5. MAPAS DE GEORREFERENCIAMENTO</i>	85
CONCLUSÕES	87
BIBLIOGRAFIA	88

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 - Esquema da partícula viral de DENV-----	12
Figura 2 - Organização do genoma RNA de DENV e esquema do processamento proteolítico da poliproteína transcrita -----	13
Figura 3 - Diagrama do ciclo de multiplicação de DENV em célula animal -----	18
Figura 4 - Desenho esquemático com as características que distinguem <i>Ae. aegypti</i> -----	21
Figura 5 – Diagrama esquemático da multiplicação do DENV no vetor.-----	22
Figura 6: Mapa com a área dos países com risco de infecção de dengue em 2006, de acordo com a Organização Mundial de Saúde-----	28
Figura 7 - Distribuição do <i>Ae. aegypti</i> nas Américas em: 1930, 1970 e 2001 -----	29
Figura 8 - Casos de dengue notificados nas regionais de Belo Horizonte, Minas Gerais, entre o ano de 2002 e julho de 2006. -----	32
Figura 9 – Área de coleta de ovos e mosquitos de <i>Aedes</i> no Bairro Serrano, Belo Horizonte (MG)--	40
Figura 10 - Esquema de disposição dos métodos de amostragem nos quarteirões-----	41
Figura 11: Tipos de métodos de amostragem utilizados no presente trabalho para captura de ovos e adultos de <i>Aedes aegypti</i> . -----	42
Figura 12 - Número de mosquitos adultos de <i>Ae. aegypti</i> capturados em três dos quatro tipos de metodologia de amostragem empregadas neste estudo.-----	49
Figura 13 – Número de ovos coletados em Ovitrapa e número dos ovos eclodidos, nas semanas epidemiológicas 41/2005 a 21/2006.-----	50
Figura 14 - Comparação dos métodos de extração de RNA para amplificação da região genômica C-prM de <i>Flavivirus</i> .-----	54
Figura 15 - Teste de sensibilidade de detecção do genoma viral pela técnica de RT-PCR-“Semi-Nested”. -----	55
Figura 16 –Amplificação do genoma viral das amostras de mosquitos por -----	57
Figura 17 – Detecção do genoma viral amplificado por “Semi-Nested”-PCR, nos “pools” de-----	58
Figura 18 - Detecção do genoma viral amplificado por “Semi-Nested”-PCR, nos “pools” de -----	59
Figura 19 - Detecção do genoma viral amplificado por “Semi-Nested”-PCR, nos “pools” de larvas analisados. -----	60
Figura 20 - Alinhamento da sequência de nucleotídeos (A) e inferida de aminoácidos (B) da região de junção dos genes C-prM do genoma de DENV detectado por “Semi-Nested”-PCR: P11; P15; P17 e P1 com outras seqüências de <i>Dengue virus 3</i> depositadas no GenBank-----	66
Figura 21 - Árvore filogenética de DENV construída com seqüências da região de junção dos genes C-prM. -----	69
Figura 22 – Mapa esquemático do bairro Serrano, apresentando os casos de FD confirmados, em local e datas determinados.-----	70

Figura 23 – Co-localização	71
Figura 24 – Co-localização	74
Figura 25 – Co-localização	75
Figura 26 – Co-localização	77
Figura 27 – Geolocalização dos quarteirões do bairro Serrano em estudo de coleta de mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>, para a armadilha Aspirador de Nasci.	78
Tabela 1 – Número de mosquitos e ovos coletados nas 32 semanas epidemiológicas (outubro de 2005 a maio de 2006) no Bairro Serrano, Belo Horizonte, MG.	51
Tabela 2 – Número de mosquitos e larvas analisados por RT-PCR	53
Tabela 3 - Identidade de nucleotídeos e de aminoácidos entre as seqüências da região de junção dos genes C-prM de amostras de mosquitos adultos e larvas de <i>Dengue virus 3</i>, do Brasil (Belo Horizonte), da China e das Filipinas.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

µg - micrograma

µL – microlitro

ADE - antibody-dependent-enhancement (exacerbação dependente de anticorpo)

AT – adenina e timina

C- proteína do capsídeo

cDNAs - DNA complementares

CG – Citosina e guanossina

DC-SIGN - dendritic-cell-specific ICAM-grabbing non-integrin

DENV 1 a 4 – *Dengue virus* sorotipos 1 a 4

dNTP's – Deoxinucleotídeos tri-fosfatados

E – proteína do envelope

FD – Febre do dengue

FHD- Febre hemorrágica do dengue

Funasa - Fundação Nacional de Saúde

g – gramas

IFN – Interferons

IL – Interleucinas

JEV - vírus da encefalite japonesa

KDa – quilodaltons

Km² - Quilômetros quadrados

L1, L2, L3 e L4 – estádios de desenvolvimento larval

L-15 - meio Leibowitz-15

M – Molar

M – Proteína de membrana

mL – mililitro

mM – milimolar

mm³ – milímetros cúbicos

M-MLV – Moloney murine leukemia virus

nm – nanômetros

NS - proteína não-estrutural

Nt - nucleotídeos

°C – graus Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF – janela aberta de leitura

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – pares de bases

PEG – Polietileno Glicol

PFU - unidade formadora de placa

pmol – picomoles

prM – precursor da proteína de membrana

q.s.p – quantidade suficiente para

RE – Retículo endoplasmático

RNA - ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa

SCD - síndrome do choque da dengue

SIG - Sistema de Informações Georreferenciadas

TBEV - vírus da encefalite veiculada por carrapato

TNF α – fator de necrose tumoral α

U – Unidades internacionais

UTR - região não traduzida

v/v – volume por volume

WNV - vírus do oeste do Nilo

YFV - vírus da febre amarela

RESUMO

Palavras-chave: *Dengue virus*, epidemiologia, método de monitoramento, *Aedes*.

O *Dengue virus* é o agente etiológico da dengue, a arbovirose mais prevalente no mundo, sendo, anualmente, notificados cerca de 50 milhões de casos. Os mosquitos vetores da dengue pertencem ao gênero *Aedes*, sendo a espécie *Aedes aegypti*, o principal vetor. Este trabalho busca o aprimoramento de técnicas de detecção do genoma de *Dengue virus* em larvas e mosquitos adultos a fim de otimizar os métodos de predição de epidemias que utilizam armadilhas para captura do vetor. Neste trabalho, a presença do genoma viral em mosquitos e larvas foi analisada por RT-PCR. As larvas e mosquitos adultos processados pertencem a um bairro da regional Noroeste de Belo Horizonte, MG, que apresenta os maiores índices de prevalência de dengue nos últimos anos, em Belo Horizonte (36% do total de casos notificados até 2006). Para a captura de ovos e mosquitos adultos foram utilizados quatro métodos de amostragem: Ovitrapa, BG-Trap[®], MosquiTRAP[®] e Aspirador de Nasci[®]. Dos insetos coletados, 661 fêmeas, 372 machos e 28808 larvas foram macerados e submetidos à extração de RNA. A presença do genoma viral foi detectada por RT-PCR em 13,2% dos “pools” de larvas de *Ae. Aegypti*, em 16,6% dos pools de machos da BG-Trap[®] e em 20% dos pools de machos do Aspirador de Nasci. Para os pools de fêmeas analisados, foi encontrada a presença do genoma viral numa percentagem de 14,3% para a BG-Trap[®] e 16,6% para a MosquiTRAP. As técnicas moleculares utilizadas se mostraram eficientes, sendo a presença do genoma viral detectada em até 0,1 PFU. As armadilhas se mostraram eficientes na captura do vetor, sendo a MosquiTRAP[®] mais eficiente em coletas de fêmeas grávidas, capazes de transmitir o vírus. A metodologia é eficiente e pode ser empregada em programas de monitoramento para controle e prevenção da doença.

INTRODUÇÃO

1. FAMÍLIA *Flaviviridae*

O agente etiológico da Febre do Dengue (FD), *Dengue virus* (DENV), pertence à ordem *Nidovirales* e à família *Flaviviridae*. O nome *Flaviviridae* (do latim, *flavus* = amarelo) foi estabelecido por Westaway *et al.* (1985).

A família *Flaviviridae* é composta por três gêneros: *Hepacivirus*, ao qual pertencem os vírus da hepatite C; *Pestivirus*, que inclui os causadores da diarréia bovina; e *Flavivirus*, onde estão agrupados o DENV e o vírus da febre amarela, entre outros (Comitê Internacional de nomenclatura de vírus - ICTV, 2006).

2. GÊNERO *Flavivirus*

Além do DENV, outros importantes patógenos humanos, como o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite veiculada por carrapato (TBEV), o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus do oeste do Nilo (WNV), pertencem ao gênero *Flavivirus*. A maioria destes vírus é transmitida por mosquitos ou carrapatos infectados (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Os vírus deste gênero são de grande relevância médica e veterinária, e a importância destes como patógenos humanos tende a aumentar cada vez mais, por causa de fatores como a migração de pássaros e também de fatores antrópicos, como urbanização, mudanças no uso da terra e da água e destinação do lixo doméstico (Mackenzie *et al.*, 2004).

Todos os *Flavivirus* possuem epitopos comuns ao grupo e estes estão localizados na proteína do envelope, o que resulta em reações cruzadas em testes sorológicos. Isto é especialmente importante entre os quatro sorotipos de DENV (revisado por Gubler, 1998). O DENV possui quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados *Dengue virus 1* (DENV-1), *Dengue virus 2* (DENV-2), *Dengue virus 3* (DENV-3) e *Dengue virus 4* (DENV-4).

Estudos filogenéticos mostram que o DENV-4 foi o primeiro a divergir, seguido do DENV-2, e por último, ocorreu a divergência entre o DENV-1 e DENV-3 (revisado por Holmes & Twiddy, 2003; Weaver & Barret, 2004). Não está claro em qual região geográfica surgiu o DENV. A hipótese mais aceita é

que tais vírus teriam surgido na Ásia, devido à posição filogenética basal das amostras silvestres encontradas neste continente (Wang *et al.*, 2000). O DENV-1 é classificado em dois genótipos, DENV-2 em cinco genótipos, DENV-3 em quatro genótipos e o DENV-4 apresenta apenas um genótipo, com base na seqüência do gene do envelope (E) (Lanciotti *et al.*, 1997).

3. PARTÍCULA VIRAL E GENOMA

A partícula do DENV apresenta forma esférica e capsídeo de simetria icosaédrica, com diâmetro de 40 a 50 nm, contendo três proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo C, a proteína **M** e a proteína glicosilada do envelope E (revisado por Melino & Paci, 2007). A partícula viral é composta de 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidratos e 17% de lipídios (Figura 1). O DENV pode ser inativado por solventes orgânicos e detergentes (Leysen *et al.*, 2000), e quando submetida a uma temperatura de 56°C durante 30 minutos (Russel *et al.*, 1980).

O genoma composto por RNA fita simples dos *Flavivirus* contém aproximadamente 11.000 nucleotídeos (nt), que possui uma janela aberta de leitura ladeada por duas regiões denominadas 5' e 3'UTRs (região não traduzida), com 100 e 600 nt, respectivamente. A região 5' terminal do genoma de *Flavivirus* apresenta uma estrutura "cap" tipo 1 (m7GpppAm) seguida por uma seqüência dinucleotídeos conservada 5'-AG-3'. A 3'UTR apresenta uma estrutura de "stem-loop" muito conservada que é necessária para a multiplicação viral (revisado por Alvarez *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). O genoma dos *Flavivirus* tem polaridade positiva, sendo traduzido em uma poliproteína após sua liberação no citoplasma. A poliproteína formada é clivada em três proteínas estruturais (E, prM e C) e em sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (revisado por Aleshin *et al.*, 2007) (Figura 2).

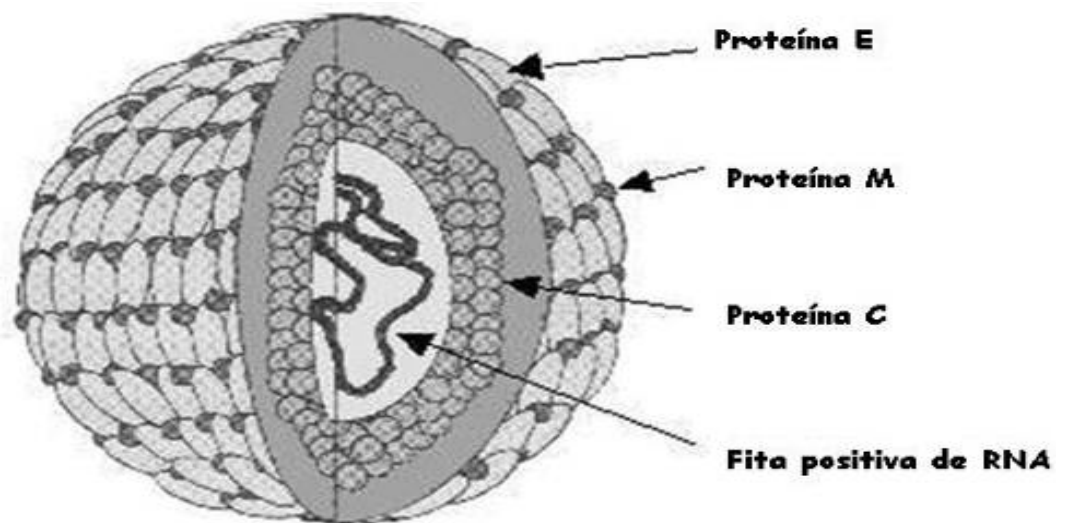
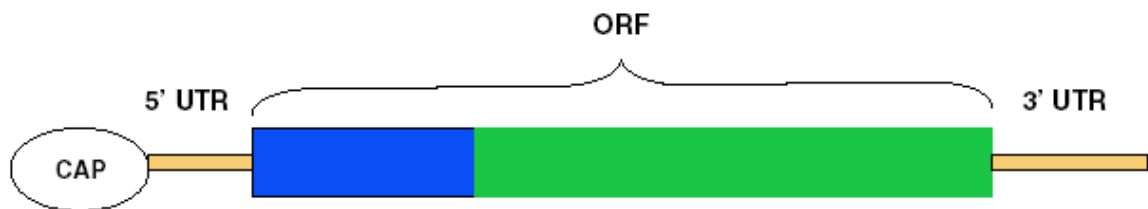


Figura 1: Esquema da partícula viral de DENV
(Fonte: [persono.wanadoo.fr./images/virusDengue malard.jpg](http://persono.wanadoo.fr./images/virusDengue%20malard.jpg)).



Poliproteína e processamento

Proteínas Estruturais

Proteínas Não-Estruturais

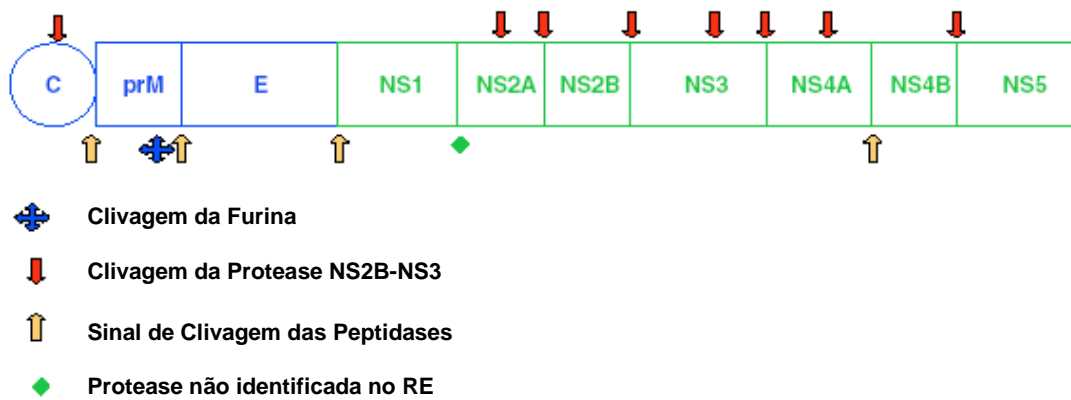


Figura 2: Organização do genoma RNA de DENV e esquema do processamento proteolítico da poliproteína transcrita (Fonte: revisado por Melino & Paci, 2007).

Estudos de genética evolutiva dos vírus do gênero *Flavivirus* sugerem que a população viral vem se diversificando devido a altas taxas de recombinação ou simplesmente pelo aumento do número de hospedeiros humanos. Além disso, os vírus com genoma RNA, que possuem RNA-polimerase RNA dependente, sofrem mutações freqüentes, em média, ocorre um erro a cada ciclo de replicação do genoma (Holmes & Burch, 2000).

4. PROTEÍNAS VIRAIS

A proteína E (50 kDa) é o maior e mais importante antígeno da superfície viral e parece desempenhar papel importante na adsorção e ligação a receptores celulares. Essa proteína é o principal alvo de anticorpos neutralizantes. Mutações na proteína E podem comprometer a patogênese viral (Lindebach & Rice, 2001).

A proteína *prM* é um precursor glicosilado (26 KDa) da proteína estrutural M (8KDa). *PrM* sofre uma clivagem tardia dando origem à proteína **M** e ao fragmento N-terminal *pr*, que é secretado no meio extracelular. A proteína C do vírus é uma proteína pequena (12-14 kDa), altamente básica, que forma o capsídeo da partícula viral dos *Flavivirus* (revisado por Melino & Paci, 2007).

A glicoproteína NS1 (42-50 kDa) está presente na superfície de organelas membranosas, é expressa na superfície das células infectadas por DENV e é também secretada na circulação como um multímero, sendo um importante alvo dos anticorpos contra DENV. A colocalização de NS1 com RNA dupla fita nas células infectadas, e outras evidências, sugere que esta proteína esteja envolvida na replicação do RNA de DENV (revisado por Chaturvedi *et al.*, 2006; revisado por Melino & Paci, 2007).

A proteína NS3 (69 kDa) é uma proteína multifuncional com um domínio protease N-terminal (NS3pro), uma RNA trifosfatase, uma RNA helicase e um domínio NTPase estimulado por RNA na região C-terminal (revisado por Melino & Paci, 2007).

A proteína NS5 (103 a 104 kDa) é uma proteína básica e a mais conservada das proteínas dos *Flavivirus*. A NS5 está envolvida na replicação de RNA viral funcionando como uma RNA polimerase RNA-dependente (Batista *et al.*, 2001).

Entre as regiões muito conservadas de NS1, NS3 e NS5 são encontradas regiões hidrofóbicas menos conservadas que dão origem a outras quatro proteínas não estruturais NS2A, NS2B, NS4A, NS4B. Estas proteínas são pouco conservadas e estão associadas à membrana da célula infectada (Rice,1996).

5. MULTIPLICAÇÃO VIRAL

Os vírus do gênero *Flavivirus* infectam diferentes tipos de células em humanos, como células dos sistemas imune e nervoso, fígado, rim e pâncreas (revisado por Stein & Shi, 2008). Análises de microscopia eletrônica mostram que a adsorção do DENV é independente da temperatura, ocorrendo a 4°C ou 37°C, mas o processo de penetração ocorre somente a 37°C (Figura 3 - 1) (Barth, 1992).

Após interação com os receptores e outras moléculas na superfície da célula, os vírus são endocitados e transportados em vesículas endossomais (Figura 3 - 2). Estudos sugerem algumas proteínas de superfície celular, como DC-SIGN (*dendritic-cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*) com função de “attachment factor”; proteína regulada por glicose 78 (GRP78/BiP) e moléculas associadas com CD-14 como receptores primários para o DENV (Lozach *et al.*, 2005) (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

As partículas virais são encontradas em vesículas pré-lisossomais após a penetração. Por um processo de fusão de membrana, catalisado pela acidificação da vesícula, ocorre a trimerização irreversível da proteína E que promove a fusão do envelope viral com a membrana endossomal celular, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (Figura 3 - 3). Com a dissociação do capsídeo e do genoma, o RNA genômico viral é liberado no citoplasma, aonde irá se associar a ribossomos para dar início à tradução da poliproteína viral (Figura 3 – 4, 5, 6) (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Após a produção suficiente de proteínas virais (Figura 3 - 7), são formados os complexos de replicação do RNA e as fitas genômicas RNA positivas servem de molde para a produção de fitas genômicas RNA negativas, que servirão de molde para a produção de mais fitas genômicas RNA positivas (Figura 3 - 4). Toda a síntese de RNA acontece em estreita associação a estruturas de membrana do citoplasma. As fitas genômicas RNA positivas

geradas podem ser traduzidas ou empacotadas na partícula viral. Após a produção de altos níveis de proteínas e genomas virais, a partícula é montada e transportada através do complexo de Golgi para ser secretada da célula (Figura 3 – 9-12) (revisado por Stein & Shi, 2008).

6. TRANSMISSÃO DO *Dengue virus*

A transmissão do DENV pelo mosquito *Ae. aegypti*, descrita primeiramente por Bancroft em 1906, foi posteriormente comprovada por Siler *et al*, 1926 e Simmons *et al*, 1931. O vírus foi primeiramente isolado em camundongos por Sabin e Schlesinger em 1944 (Sabin & Schlesinger, 1945).

Em áreas tropicais, a transmissão do DENV ocorre durante todo o ano. Um aumento é percebido no período mais chuvoso, quando a temperatura é maior. Estudos demonstraram que o aumento da temperatura diminui o período de incubação extrínseco (Watts *et al*, 1987). O período extrínseco de incubação se refere ao intervalo de tempo entre a multiplicação viral no mosquito até a migração para a glândula salivar de onde é capaz de ser transmitido. Este período varia de 8 a 12 dias (Service, 1992 in McBride and Bielefeldt-Ohamann, 2000). O mosquito *Ae. aegypti* está adaptado a se reproduzir nos ambientes domésticos e peridomésticos, utilizando-se de recipientes que armazenam água potável e de recipientes descartáveis que acumulam água das chuvas, comumente encontrados nos lixos das cidades (Camara *et al.*, 2007).

O crescimento da população global, a urbanização não planejada e descontrolada em países tropicais em desenvolvimento, além da falta de controle efetivo do mosquito em áreas onde a FD é endêmica, criaram condições ideais para a transmissão aumentada de doenças veiculadas por mosquito em centros urbanos tropicais (Gubler & Trent, 1993). O crescimento do transporte aéreo que permite o trânsito rápido de pessoas e mosquitos infectados pelo vírus para qualquer país do mundo, também é considerado

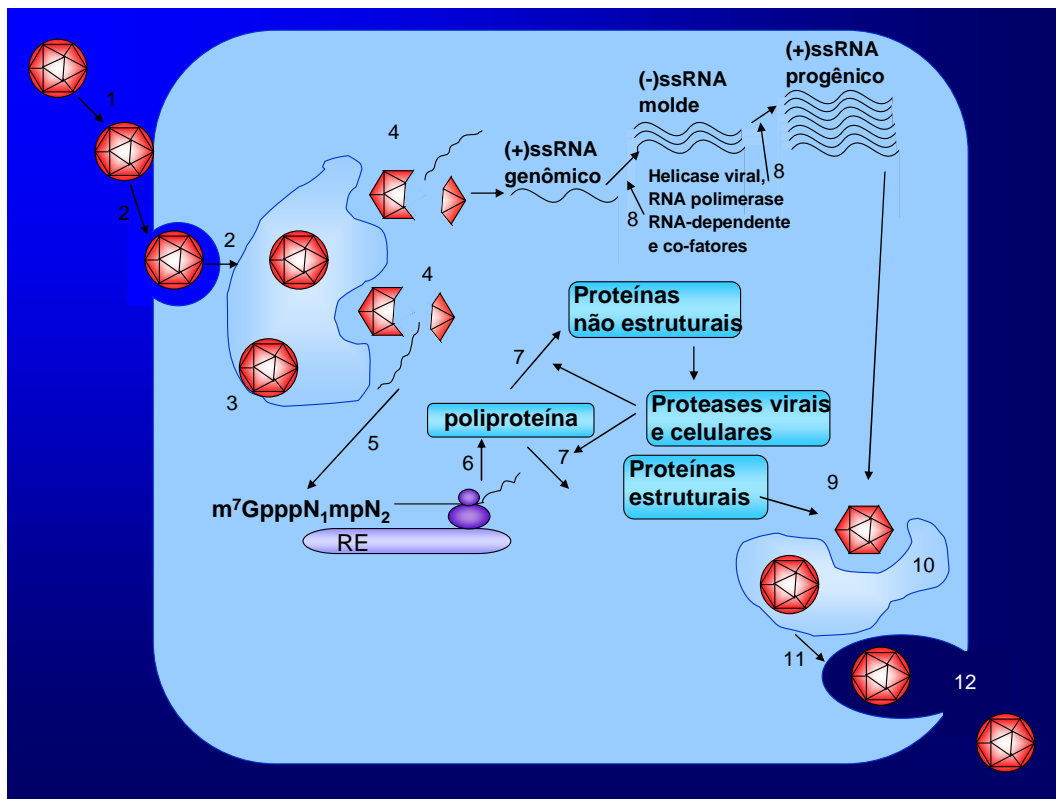


Figura 3: Diagrama do ciclo de multiplicação de DENV em célula animal (Fonte: Leyssen *et al.*, 2000). 1 – Adsorção da partícula viral. 2 – Penetração. 3 – Desnudamento do material genético viral. 4 – Liberação do genoma RNA polaridade positiva para tradução da poliproteína e replicação da fita RNA positiva. 5 – Associação do RNA fita positiva aos ribossomos celulares. 6 – Tradução da poliproteína. 7 – Clivagem das proteínas estruturais e não-estruturais. 8 – Replicação do material genético viral. 9, 10 e 11 – Montagem da partícula viral. 12 – Liberação do vírus maduro.

fator relevante na transmissão do DENV (Gubler e Trent, 1993).

Estudos demonstraram que a densidade populacional do vetor e fatores de exposição à fêmea do mosquito infectada são fatores importantes na taxa de transmissão do vírus (Ilkal *et al.*, 1991). Outro fator importante é o hábito alimentar descontínuo da fêmea do mosquito *Ae. aegypti*, que possibilita a transmissão rápida do vírus através da alimentação de sangue entre uma postura e outra (Rice, 1996).

7. MULTIPLICAÇÃO DE *Dengue virus* NO VETOR

O *Ae. aegypti*, o principal transmissor da FD e da Febre amarela em todo o mundo, pertence à família *Culicidae*, gênero *Aedes*. O mosquito foi importado da África para a América e atualmente, é encontrado em todos os estados brasileiros. As espécies do gênero *Aedes* possuem aparelho bucal picador, medindo de 3 a 5 mm de comprimento, com tórax, pernas e asas cobertas por escamas de coloração escura com faixas brancas. O macho se distingue da fêmea porque tem as antenas mais plumosas (Funasa, 2001) (Figura 4).

O *Ae. aegypti* é um inseto holometábolo, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva (quatro estágios = L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. Caracterizado como um inseto de comportamento estritamente urbano é raro encontrar amostras de seus ovos ou larvas em reservatórios de água nas matas. Mesmo assim, macho e fêmea alimentam-se da seiva das plantas, presentes, sobretudo, no interior das casas. Apenas a fêmea pica o homem em busca de sangue para maturar os ovos, alimentando-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando perturbadas antes de estar totalmente ingurgitada de sangue. Essa característica aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e/ou transmitir o vírus (Barata *et al.*, 2001). Em média, cada *Ae. aegypti* vive em torno de 30 dias e a fêmea chega a colocar cerca de 500-600 ovos durante sua vida. Ela é capaz de realizar inúmeras posturas no decorrer de sua vida, armazenando os espermatozóides em suas espermatecas (reservatórios presentes dentro do aparelho reprodutor). Uma vez infectada pelo DENV, a fêmea torna-se vetor permanente da doença e calcula-se que haja uma probabilidade entre 30 e 40% de chances de suas crias já nascerem também infectadas (<http://www.embu.sp.gov.br/noticias/exibir.php?id=529>)

Os criadouros utilizados pelas fêmeas para a postura dos ovos são recipientes que contenham água parada e limpa. Geralmente, pneus sem uso, latas, garrafas, vasos de planta, caixas d'água descobertas, piscinas sem uso, dentre outros (Consoli & Oliveira, 1994).

Para que a transmissão do vírus ocorra, a fêmea de *Ae. aegypti* deve picar uma pessoa infectada, que esteja na fase de viremia, que varia geralmente de 4 a 12 dias após o contato com o vírus (revisado por Gubler, 1998). Após a ingestão de sangue contaminado há a infecção das células do trato digestivo (Figura 5 – 1, 2). O vírus escapa do epitélio digestivo para a hemocele, entra na corrente hemolinfática (Figura 5 - 3) e infecta as glândulas salivares (Figura 5 – 4a, 4b), onde se multiplica e, posteriormente, é secretado junto com a saliva (Figura 5 - 5) durante a picada da fêmea. O trato genital pode ser infectado e os vírus podem penetrar nos ovos, no momento da oviposição (Rosen, 1987) (Figura 5).

O mosquito pode ser infectado com mais de um sorotipo de DENV, podendo ser transmitidos simultaneamente (Lam & Marchall, 1968). O *Ae. aegypti* é considerado o mais importante vetor do *Dengue virus*, devido ao alto número populacional e a grande adaptabilidade ao ambiente domiciliar. A relação vírus/vetor pode ser um fator na seleção e propagação de linhagens patogênicas de DENV em área urbana (Gubler, 1988).

A existência de mosquitos machos infectados é explicada pela transmissão transovariana, e as fêmeas também podem ser infectadas através de cópula com machos infectados (Rosen, 1987).

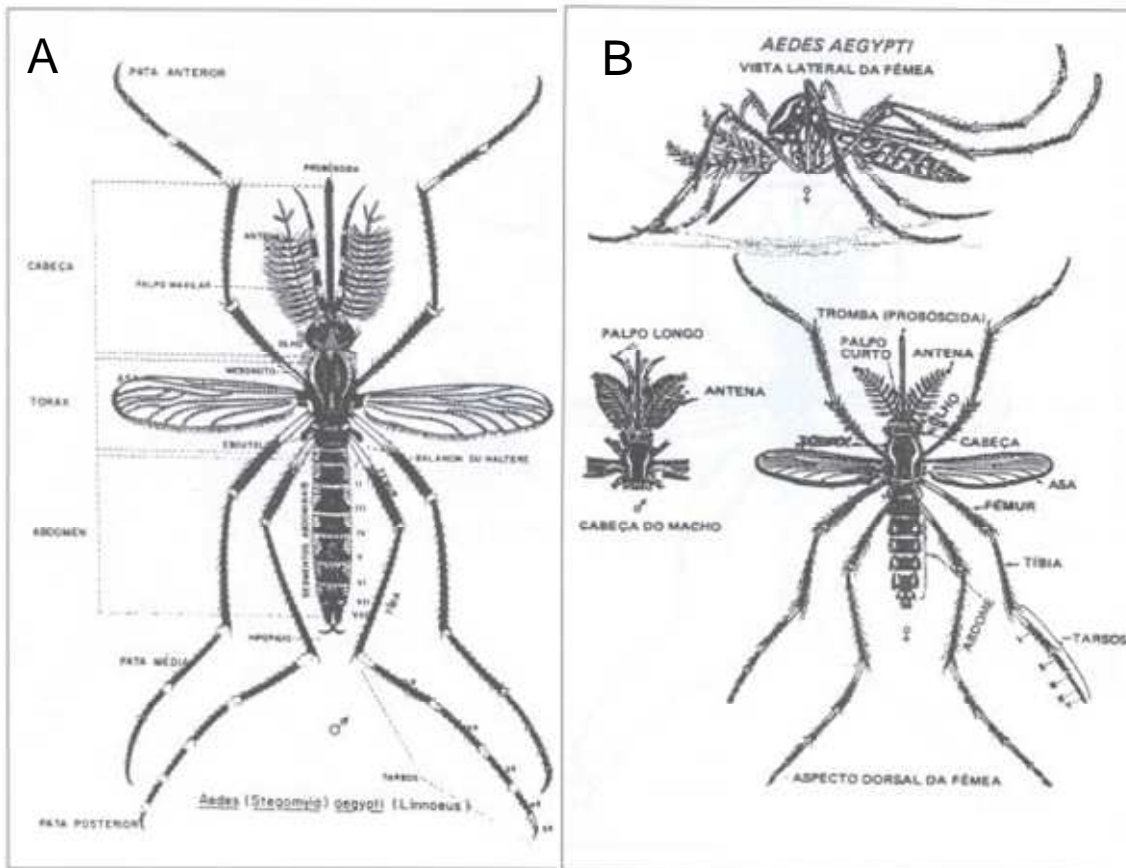


Figura 4 – Desenho esquemático com as características que distinguem mosquitos machos de fêmeas. A – Desenho esquemático de um mosquito macho. B – Desenho esquemático de um mosquito fêmea. Destaque às características que diferenciam machos de fêmeas (www.pbh.gov.br/smsa/bhdengue/imagens/naparede.jpg).

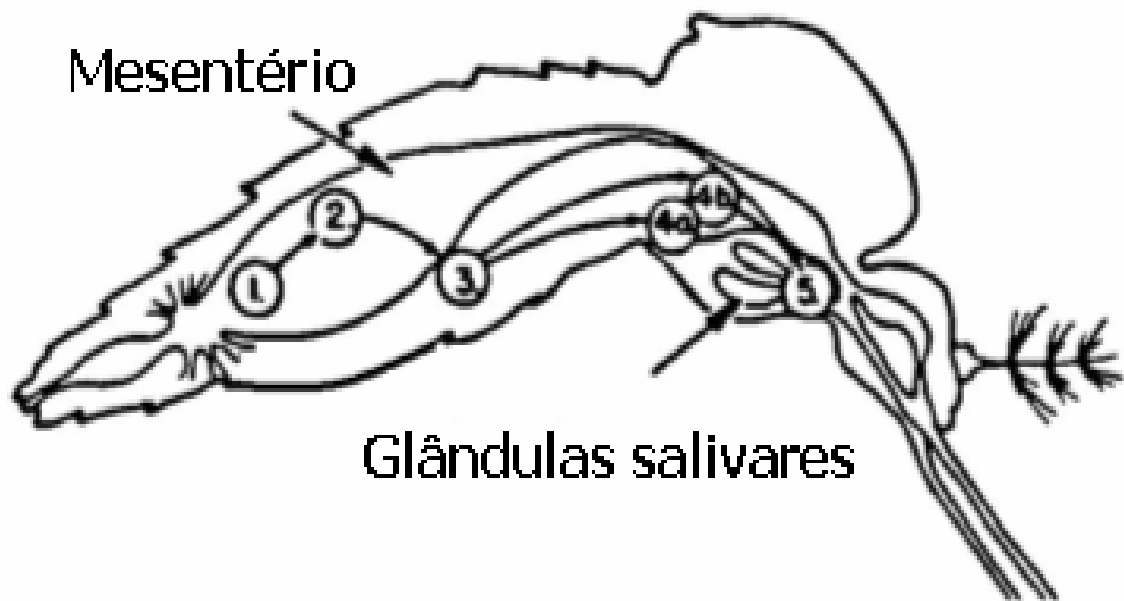


Figura 5 – Diagrama esquemático da multiplicação do DENV no vetor. 1 – Sangue de hospedeiro virêmico no mesentério da fêmea. 2 – Infecção pelo vírus das células do mesentério. 3 – Entrada do vírus na hemocele. 4a – Infecção viral das glândulas salivares após infectar outros órgãos e tecidos. 4b - Infecção viral das glândulas salivares sem infecção de outros órgãos e tecidos. 5 – Vírus secretado junto com a saliva, durante a picada da fêmea (Lindebach & Rice, 2001).

8. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DENGUE

As infecções por DENV em humanos podem resultar em duas síndromes bem definidas FD e Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome de Choque do dengue (FHD)/(SCD). As manifestações variam de reações brandas a comprometimentos graves e/ou letais (Halstead, 2007).

A FD é caracterizada por uma febre súbita e uma variedade de sinais e sintomas inespecíficos como dor de cabeça frontal e retro-orbital, dores no corpo, mialgia, náusea e vômito, fraqueza e erupção cutânea (Kalayanarooj *et al.*, 1997). Os pacientes podem ter anorexia, alteração da sensação de gosto e dor de garganta. Ocasionalmente, são descritos constipação, diarreia e sintomas respiratórios (revisado por Gubler, 1998).

A febre pode durar de dois a sete dias, período que se correlaciona com a detecção do vírus no sangue, e pode ser interrompida por alguns dias, voltando após 12 a 24 horas (revisado por Gubler, 1998). Uma bradicardia relativa pode ser notada apesar da febre. A conjuntiva pode ficar edemaciada e a faringe inflamada. O aparecimento de leucopenia é comum. A erupção cutânea é variável e acontece em até 50% dos pacientes, coincidente com a febre desaparecendo um a dois dias depois. Uma segunda erupção cutânea, variando de escarlatiniforme para maculopapular, pode aparecer entre o 2º e 6º dias da doença e normalmente começa no tronco e se expandindo para a face e extremidades, podendo também aparecer petéquias que podem se espalhar ou confluir (Monath & Heinz, 1996). Hemorragias do trato gastrointestinal e hematúria podem ocorrer, porém são mais raras. Uma trombocitopenia (<100.000 trombócitos/mm³ de sangue) é freqüentemente observada nos casos clínicos (Huang *et al.*, 2000).

A FHD se inicia de forma similar a FD, com súbito acesso de febre e vários sintomas não específicos. Porém, quando ocorre defervescência, o paciente apresenta uma piora no quadro clínico. Alguns sinais como resfriamento da pele e letargia começam a aparecer (revisado por McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000). Trombocitopenia e hemoconcentração são observados e servem como sinal de extravasamento plasmático. A doença pode progredir para congestão da pele, cianose ao redor da boca e pulso rápido e fraco. Sintomas hemorrágicos como sangramento na pele, na gengiva, no nariz, hemorragia do trato gastrointestinal e hematúria são freqüentemente

observados. Uma terapia de reposição de líquido plasmático é recomendada quando o paciente apresenta este quadro, podendo evitar que o paciente venha a óbito (revisado por Gubler, 1998).

A gravidade da FHD é classificada em quatro categorias de acordo com sinais clínicos. Na categoria um (1) estão classificados os casos que apresentam febre acompanhada de sintomas não específicos, com teste do torniquete positivo. Na categoria dois (2) estão os casos que apresentam sangramento espontâneo, usualmente gengiva, nariz e pele. Na categoria três (3) estão os casos que apresentam falha circulatória, com pulso rápido e fraco e hipotensão. Na categoria quatro (4) estão os casos onde o paciente moribundo apresenta pulso e pressão não detectáveis (revisado por McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000).

As categorias 3 e 4 são denominadas SCD. Em todos os casos, nenhuma alteração histopatológica é observada nas células endoteliais, sugerindo que as alterações vasculares observadas na FHD e SCD são devidas alterações funcionais ao invés de anatômicas (revisado por Gubler, 1998). As manifestações mais graves estão associadas às áreas onde circulam mais de um sorotipo viral ou onde houve uma seqüência de epidemias causadas por diferentes sorotipos (Holmes & Burch, 2000).

9. PATOGÊNESE VIRAL

Monócitos e macrófagos são considerados as células alvo na infecção por DENV (Halstead, 1980). Estudos realizados com pacientes infectados com DENV mostraram que a linhagem monocítico/macrofágica de órgãos linfóides, pulmão e fígado estava infectada com DENV (revisado por McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000). Lozach e colaboradores, 2005, apontam as células dendríticas como as células alvo primárias na infecção por DV. Pesquisas recentes detectaram a presença de DV no endotélio vascular de tecidos de biópsia de camundongos infectados com DV, que apresentaram hemorragia, indicando que as células endoteliais também são alvos de DV (Chen *et al*, 2007). As células da linhagem monocítico/macrofágica podem agir como apresentadoras de antígeno e secretar citocinas que participam da ativação das células T e produção de citocinas ativadoras de macrófagos (Braga *et al*, 2001).

Algumas hipóteses foram levantadas para tentar explicar as manifestações mais graves na infecção por DENV. Uma das hipóteses admite os fatores do hospedeiro como causa principal, e a outra hipótese admite os fatores virais como mais importantes (revisado por Gubler, 1998).

A primeira hipótese teve indícios na Tailândia, nos anos 60. Em 85% das crianças observadas com FHD, foram encontrados altos títulos de anticorpos com reatividade cruzada entre os sorotipos, indicando infecção prévia (Halstead, 1970). Em 1999, Watt e colaboradores encontraram quadro semelhante em 60,5% dos pacientes estudados. Esta hipótese demonstra que pacientes que experimentam uma segunda infecção com vírus de sorotipo diferente têm um risco significativamente mais alto para desenvolver FHD. Os anticorpos preexistentes, devido à primeira infecção, reconhecem o vírus de sorotipo diferente e formam um complexo antígeno-anticorpo que é internalizado através de receptores de imunoglobulinas na membrana de macrófagos, assim o vírus não é neutralizado e pode se multiplicar. Esse processo é conhecido como aumento dependente de anticorpo (ADE– antibody-dependent-enhancement), pois aumenta a infecção e multiplicação do vírus em células da linhagem mononuclear (Brandt, 1982). Essas células produzem e segregam mediadores vasoativos aumentando a permeabilidade vascular que conduz a hipovolemia e choque. Altos níveis de citocinas e outros marcadores de células T ativadas, como TNF α , IFN γ , receptores sTNF, receptores sIL-2, células CD4 e IL-6, sustentam o papel das citocinas no aumento da permeabilidade capilar (revisado por Solomon & Mallewa, 2001).

Nem todas as infecções secundárias levam a FHD/SCD e estas síndromes podem ocorrer em uma infecção primária (revisado por McBride & Bielefeldt-ohmann, 2000). Desta forma, ganha força a segunda hipótese que dá maior importância a fatores do vírus. Esta hipótese sugere que fatores genéticos determinam a existência de linhagens mais virulentas dentro do mesmo sorotipo. A primeira epidemia de FHD em Cuba, em 1981, coincidiu com a introdução de um novo genótipo do DENV-2, vindo do sudeste Asiático (revisado por McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000). Ensaios de competição em células dendríticas humanas e células de mosquitos mostram que o genótipo asiático do DENV-2 tem maior taxa de multiplicação e pode sobrepor o genótipo americano na população (Cologna *et al.*, 2005).

Análises genotípicas recentes identificam mutações associadas à virulência. Essas mutações ocorrem em regiões conhecidas por afetarem a virulência “in vitro”. Um exemplo deste fato são mutações na região 3'-UTR, seqüência fundamental para a replicação, tradução e brotamento viral, que estimula anticorpos neutralizantes e induz resposta imune celular (Holmes & Burch, 2000). A variação e mudanças genéticas, como resultado de pressões seletivas, levam à expressão de fenótipos de maior virulência aumentando a gravidade da doença e o potencial epidêmico (Leitmeyer *et al*, 1999).

10. EPIDEMIOLOGIA

As infecções causadas pelo DENV colocam em risco 2,5 bilhões de pessoas que vivem nas regiões tropicais e subtropicais, nas pequenas e grandes cidades. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 50-100 milhões de pessoas se infectem, anualmente, em 100 países de todos os continentes, com exceção da Europa. Dessas pessoas pelo menos 20 mil morrem da doença (Funasa, 2001) (Halstead, 2007) (Figura 6).

A incidência mundial da FD vem aumentando desde a 2ª Guerra, devido à expansão das populações urbanas, à urbanização desordenada, ao aumento da densidade do *Ae. aegypti*, além do aumento dos viajantes via aérea e o rápido deslocamento de pessoas virêmicas (revisado por Gubler, 1998). Outros determinantes para a disseminação da FD incluem a ausência de infraestrutura básica de saneamento, a coleta de lixo inadequada, o aumento da produção de descartáveis, a insuficiência de recursos para programas de combate ao vetor e o surgimento de resistência dos mosquitos aos inseticidas (Funasa, 2001).

Epidemias de FD são relatadas desde o século XVIII. A primeira epidemia da doença foi descrita em 1780, na Filadélfia, por Benjamim Rush. Nas Américas, o primeiro relato ocorreu em Cuba, em 1786, e posteriormente no Brasil, em 1846.

Durante as décadas de 50 e 60, através das medidas do programa de erradicação do vetor, coordenadas pela Organização Pan Americana de Saúde, a maioria dos países da América Central e do Sul erradicou o *Ae. aegypti*. No entanto, com o término do programa de erradicação no início dos anos 70, o *Ae.*

aegypti reinfestou muitos destes países e, já no final dessa década, havia recolonizado a região (Figura 7) (Rigau-Pérez *et al.*, 1998; Gubler, 2002a).

Na década de 80, o ocidente experimentou epidemias de FD em países sem registro de dengue por muitas décadas. Novas linhagens de DENV e sorotipos foram introduzidos: DENV-1 em 1977, uma nova linhagem de DENV-2 em 1981, DENV-4 em 1981, e uma nova linhagem de DENV-3 em 1994 (Schatzmayr, 2000).

O primeiro relato de epidemia de FHD ocorreu em 1953 em Manila, Filipinas, e logo se expandiu para outras regiões e continentes acarretando graves epidemias, especialmente nas ilhas do Sul do Pacífico e nas Américas (Halstead, 1970; revisado por Gubler, 1998; Rigau-Pérez, 1998; Gubler, 2002b). No início dos anos 80, surgiram epidemias de FHD e co-circulação de três sorotipos (DENV -1, 2 e 4) (Pan American Health Organization, 1994, revisado por Guzman & Kouri, 2003). Em 1981, Cuba teve a primeira epidemia de FHD, com mais de 300.000 casos de FD, incluindo 10.000 casos de FHD e 158 mortes. Ainda no mesmo ano, o DENV-4 aparece nas ilhas do Caribe, o qual se expande para as Américas Central, do Sul e para o México nos anos subsequentes (Pinheiro & Corber, 1997, revisado por Guzman & Kouri, 2003).

Nos últimos 20 anos, as epidemias de FD ressurgiram nos trópicos, associada à expansão do vetor e do vírus. Cerca de 1 a 2 milhões de casos de FD e FHD foram relatados pela OMS, em 1998, com 3442 mortes (Guzman & Kouri, 2002). Durante 2002, os países da América Latina relataram mais de 1 milhão de casos de FD, com mais de 17.000 casos de FHD, incluindo 225 mortes (Nogueira *et al.*, 2005).

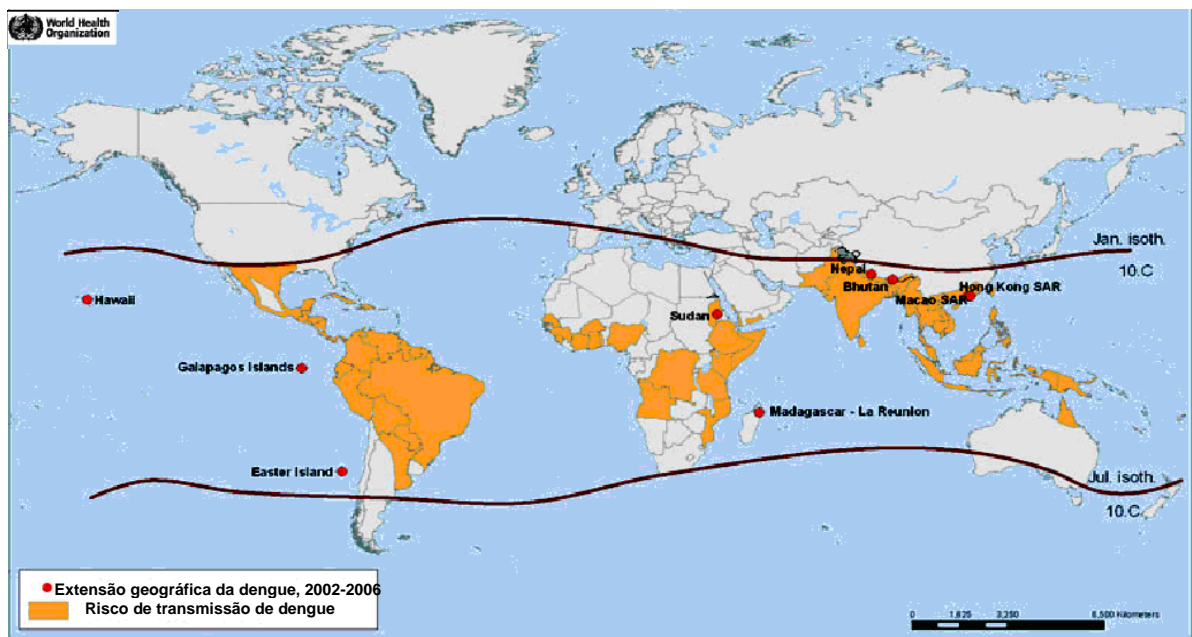


Figura 6: Mapa com a área dos países com risco de infecção de dengue em 2006, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (<http://gamapserv.who.int/mapLibrary/>).

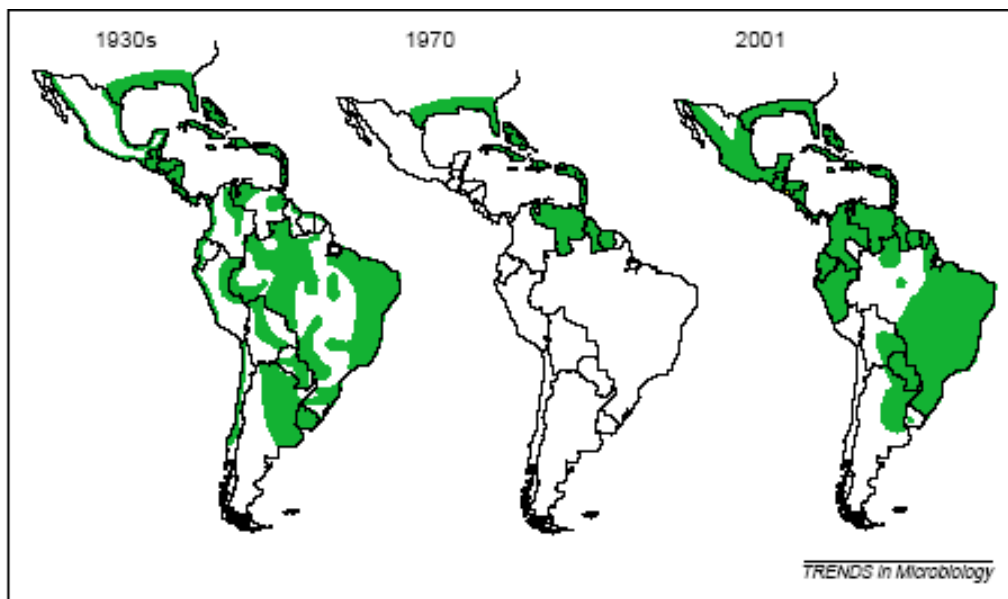


Figura 7 - Distribuição do *Ae. aegypti* nas Américas em: 1930, 1970 e 2001.
Fonte: (Gubler, 2002a).

11. DENGUE NO BRASIL

O *Ae. aegypti* foi introduzido no Brasil, no século XVI, com o tráfico de escravos. As campanhas para erradicação do *Ae. aegypti* começaram em 1903, com Oswaldo Cruz lutando contra a febre amarela (Franco, 1976). A partir de 1920, com a assistência técnica da Fundação Rockefeller, a erradicação foi feita com sucesso (Franco, 1961). Relatos de epidemias de FD no Brasil datam do início do século XIX, com menção de uma epidemia no Rio de Janeiro, em 1846 (Mariano, 1917). Epidemias de FD ocorreram também no nordeste e sudeste do Brasil durante o século XIX (Ministério da Saúde, 2000).

O reaparecimento do *Ae. aegypti* no Brasil está intimamente relacionado com o início das epidemias de FD. O primeiro sinal de reinfestação do mosquito foi observado nos estados da Bahia e do Pará, em 1967 (Figueiredo, 1996). O ressurgimento da FD no Brasil se deu oficialmente em 1981-1982, quando foi registrada uma primeira epidemia em Boa Vista (RR), onde foram isolados os sorotipos 1 e 4 (revisado por Gubler, 1998; Osanai *et al.*, 1983). Na mesma década, em 1986, foi confirmado o primeiro caso de FD no Rio de Janeiro causado por vírus do sorotipo 1 (Schatzmayr *et al.*, 1986), e quatro anos mais tarde foram confirmados casos de infecção por vírus do sorotipo 2, na mesma área. Logo após, o sorotipo 2 apareceu em Fortaleza e no sul da Bahia (Barth *et al.*, 1996). Deste ano até 1999, mais de um milhão de casos de dengue foram notificados de acordo com o Ministério da Saúde, sendo que, no ano de 1999, estes foram mais de 215.000. Os sorotipos 1 e 2 foram isolados durante essas epidemias (Figueiredo, 1996).

Nos últimos 20 anos, o Brasil sofreu várias epidemias de dengue. O vírus e o vetor se disseminaram no país e epidemias ocorreram em todas as regiões incluindo as regiões mais populosas do país (Figueiredo *et al.*, 1997). A incidência da Dengue no Brasil teve um crescimento significativo na década de noventa, atingindo o nível mais elevado em 1998, quando foram oficialmente registrados cerca de 530 mil casos. Houve uma redução acentuada em 1999, com 210 mil casos, e um pequeno crescimento em 2000, quando foram notificados 240 mil casos (Funasa, 2004).

Em 2002, o número de mortes causadas pela FHD excedeu o número de mortes por malária, pela primeira vez no Brasil. Durante este ano foi registrada

a maior epidemia na região metropolitana do Rio de Janeiro, com 250.000 casos de FD (Siqueira *et al.*, 2005).

A FD, em Minas Gerais, ocorre em diferentes áreas geográficas e em regiões sócio-econômicas diferenciadas. No ano de 2002, foram confirmados 81 casos de dengue, 49 autóctones e 32 importados e 14 destes tiveram o DENV-3 como agente etiológico (SMS, 2002, dados não publicados).

Em março de 1996, foram registrados pela primeira vez casos autóctones de FD em Belo Horizonte. Entre 1996 e 2001 foram notificados à vigilância epidemiológica 105.603 casos suspeitos de dengue, sendo 95.819 (90,7%) confirmados (Correa *et al.*, 2005).

Segundo a Funasa, em 1998, ocorreu em Belo Horizonte uma das epidemias de maior magnitude já registradas em grandes centros urbanos do Brasil, com taxa de incidência anual de 4,1%, correspondendo a 88.900 casos de FD notificados nos países do continente americano naquele ano e a 58,8% dos casos do Estado de Minas Gerais. No ano de 2002, foram notificados 10.940 casos suspeitos de FD em Belo Horizonte, sendo 4.030 confirmados, com ocorrência de 53 casos de FHD. Em 2003, ocorreram 3.756 notificações, sendo 1.548 confirmados, com 53 casos de FHD. Em 2005 foram confirmados 624 casos de dengue e o Distrito sanitário Noroeste teve o maior número de casos (114) (Secretaria Estadual de Saúde e Secretaria Municipal de Saúde)

A Regional Noroeste de Belo Horizonte é a área de maior concentração de casos de Dengue em Belo Horizonte desde 1998 e apresenta altos índices de infestação vetorial de acordo com dados da Secretaria Municipal de Saúde. Limita-se com o município de Contagem, e com as regiões da Pampulha, Nordeste e Centro-Sul. Compreende uma área de 37,63 Km², e uma população de 331.763 habitantes (censo 2000), considerada grande para essa extensão (www.pbh.gov.br/smsa) (Figura 8).

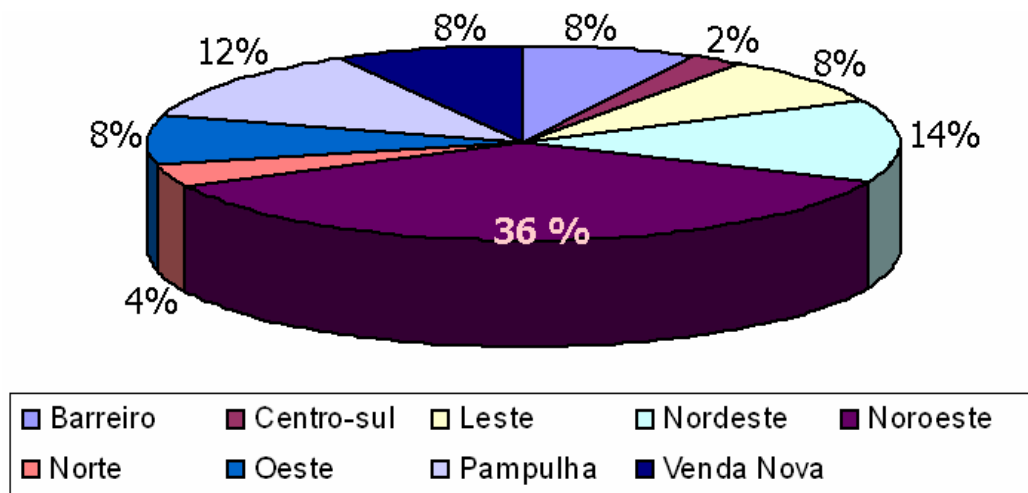


Figura 8 - Casos de dengue notificados nas regionais de Belo Horizonte, Minas Gerais, entre o ano de 2002 e julho de 2006. (Secretaria Estadual de Saúde e Secretaria Municipal de Saúde).

12. IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS

A detecção dos vírus em mosquitos é geralmente feita através de testes de imunofluorescência direta (IFD) de tecidos do mosquito como cérebro e glândula salivar (Guzman & Kouri, 1996). O diagnóstico molecular, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), tornou-se importante no diagnóstico de DENV. Várias técnicas de extração de RNA têm sido avaliadas de forma a permitir a eficácia deste teste (De Paula *et al.*, 2001). Através da PCR, o material genético e os vírus podem ser detectados diretamente no soro do paciente, no meio de cultura de células de mosquito infectadas e em larvas trituradas (Chan *et al.*, 1994; Urdaneta *et al.*, 2005).

A PCR usando transcriptase reversa (RT-PCR) foi desenvolvida para estudo de vários vírus RNA e tem revolucionado os diagnósticos de laboratório. No caso de DENV, a RT-PCR permite uma identificação sorotipo-específico rápida (revisado por Gubler, 1998). O método é sensível e reprodutível. Pode ser usado para detectar RNA viral em amostras clínicas, tecidos de autópsia, mosquitos e larvas. Foram desenvolvidos vários métodos que utilizam oligonucleotídeos iniciadores de regiões diferentes do genoma viral, como por exemplo, nos genes que codificam para as proteínas E, NS1 e NS5. Oligonucleotídeos iniciadores consenso localizados nos genes C e prM foram desenhados para amplificar um produto de 511pb através de RT-PCR seguido de PCR "Nested" usando iniciadores específicos para cada sorotipo específico (Lanciotti, 1992).

Apesar das vantagens da técnica de RT-PCR para a identificação de DENV, ela não deve ser usada como um substituto para o isolamento de vírus em cultivo de células. Os isolados são importantes para caracterizar diferenças entre linhagens (Lanciotti, 1992).

13. VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DA DENGUE

De acordo com a Fundação Nacional de Saúde (Funasa), várias medidas de infestação podem ser empregadas para avaliar os riscos de transmissão do dengue. Os índices mais utilizados são: (i) predial - relação (%) entre o número de imóveis positivos onde foram encontradas larvas e/ou pupas da espécie do vetor; (ii) de recipiente - relação (%) entre o número de recipientes com água

positivos e o número de recipientes pesquisados com água; e (iii) de Bretau – relação entre o número de recipientes positivos e o número de imóveis pesquisados, corrigido de forma que o resultado obtido diga respeito a 100 imóveis. Todos esses índices são estimativas, baseadas na população larval e não refletindo, necessariamente, o tamanho da população adulta dos mosquitos transmissores. Por essa razão, a Funasa orienta no sentido de que os três índices sejam utilizados paralelamente, de modo a oferecer uma avaliação mais segura dos riscos de transmissão (Brasil, 1996).

O controle e a erradicação da dengue representam grandes desafios. A adoção de medidas de vigilância entomológica, epidemiológica, e de combate ao vetor envolvem uma enorme gama de recursos, altos custos e inúmeras dificuldades operacionais. Além disso, não existem muitas armas à disposição das autoridades em saúde para enfrentar essa doença. A mais efetiva ainda é o combate direto ao vetor por meio de métodos químicos, físicos e/ou biológicos (Donalizio, 1999; Teixeira *et al.*, 1999). Contudo, o uso constante de inseticidas nas epidemias de dengue, o procedimento mais comum de combate ao vetor, além de contraditório, tem se mostrado incapaz de reduzir as populações dos mosquitos em níveis que impeçam a transmissão do DENV.

No Brasil, o monitoramento do *Ae. aegypti* é feito por meio da pesquisa larvária (Funasa, 2002), método pouco sensível que é realizado de 3-4 vezes/ano, utilizando muita mão-de-obra em campo e em laboratório. Além disso, este método fornece índices de risco de dengue não confiáveis (revisado por Focks, 2003).

Armadilhas de oviposição (ovitrapa) iscadas com infusões de gramíneas são mais sensíveis do que a pesquisa larvária (Braga *et al.* 2000). Este método também exige mão-de-obra em laboratório e permite quantificar apenas o número de ovos depositados, dificultando estimar a densidade populacional do vetor em uma determinada área (Gomes, 1998). O aspirador costal tem sido usado para captura de adultos de *Ae. aegypti*, em repouso, em áreas intra e peridomiciliares, necessitando grande contingente de recursos humanos (Clark *et al.*, 1994).

A MosquiTRAP[®] (Eiras, 2002) é um novo modelo de armadilha desenvolvido pelo Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores de Insetos Vetores/UFMG e patentado pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta armadilha utiliza atraente de oviposição sintético,

identificado a partir de voláteis de infusões de gramíneas (Eiras *et al.*, 2001), permitindo a captura de fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Testes de campo, realizados no município de Pedro Leopoldo (MG), comprovaram que a MosquiTRAP apresenta uma eficácia e sensibilidade semelhante à armadilha de oviposição, porém com as vantagens de não usar mão-de-obra em laboratório e agilidade nas operações de campo (Eiras *et al.*, 2003).

A BG-Trap® é uma armadilha nova que foi desenvolvida pela Universidade de Regensburg (Alemanha) (Geier & Eiras, 2003) em colaboração com o Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores. Esta armadilha utiliza o odor humano sintético (Eiras & Geier, 2002) como atraente para capturar adultos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* quando procuram o homem para o repasto sanguíneo. Em testes de laboratório a BG-Trap® capturou 90% de fêmeas de *Ae. aegypti* em apenas 10 minutos (Geier & Eiras, 2003), porém, o desempenho desta armadilha ainda não foi avaliado como um método de amostragem para o monitoramento de *Ae. aegypti*.

A empresa de biotecnologia Ecovec Ltda desenvolveu um sistema informatizado, desde a coleta de dados nas vistorias da MosquiTRAP no campo (através de dispositivos de computação móvel) até a criação de um software para processamento das informações e geração de mapas temáticos tipo Sistema de Informações Georreferenciadas (SIG). O sistema completo, integrando o uso de MosquiTRAP e Atraedes, mais dispositivo de computação móvel, software de processamento e mapas temáticos (SIG), constituíram o Monitoramento Inteligente Ecovec (MI-Ecovec).

JUSTIFICATIVA

A FD e, particularmente a sua manifestação mais grave, a FHD, estão entre as doenças infecciosas mais importantes sob o ponto de vista da saúde pública, podendo ser considerada a mais significativa arbovirose (OMS, 2001). Até o momento, não há vacina ou uma terapia específica para FD e FHD. A pré-existência de anticorpos heterotípicos para dengue é um fator de risco para a FHD, desta forma, uma vacina efetiva deve ser tetravalente e prevenir a infecção contra os quatro sorotipos de DENV (Chaturvedi *et al.*, 2005). A situação atual da dengue no Brasil e no mundo é grave e, atualmente, a única medida disponível para interromper a cadeia de transmissão do DENV é o combate ao vetor (Gluber, 1989; OMS, 2001).

Diante das dificuldades encontradas na luta anti-*Aedes*, a utilização de um sistema de vigilância ativa do dengue para detectar precocemente a ocorrência de epidemias, possibilitaria por em prática medidas de controle imediatas com o objetivo de reduzir a incidência e, desta forma, o risco de ocorrência da FD, FHD e SCD. Para tal, faz-se necessário o aprimoramento dos atuais índices entomológicos e o desenvolvimento de indicadores mais sensíveis e confiáveis que possam refletir melhor a transmissão do vírus e subsidiar programas de controle e de monitoramento do *Ae. aegypti* (Focks, 2003; Siqueira *et al.*, 2005).

Devido à necessidade de desenvolver novos métodos para estimar, monitorar e correlacionar os níveis populacionais dos mosquitos vetores com a transmissão de DENV em áreas urbanas, a incorporação dos métodos utilizados neste trabalho nos programas de combate aos vetores levará ao aprimoramento da vigilância epidemiológica e do controle da FD e suas complicações.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Monitorar a circulação do DENV em mosquitos adultos capturados em armadilhas e comparar com os casos de dengue notificados na área estudada, visando avaliar sua capacidade de atuar como preditor de ocorrência de casos humanos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar testes de detecção molecular do genoma de DENV, associando estas ferramentas aos novos métodos de captura de larvas e mosquitos adultos vetores de DENV, no município de Belo Horizonte, MG;

- Verificar a distribuição geográfica de sorotipos de DENV em Belo Horizonte, MG;

- Determinar o genótipo de DENV infectando mosquitos e larvas coletados no município de Belo Horizonte, MG.

MATERIAL E MÉTODOS

1. INSTALAÇÃO DOS MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

Na regional Noroeste, foi escolhido o bairro Serrano, que faz divisa com o município de Contagem (Figura 9), no qual foram selecionados 90 quarteirões para instalação dos métodos de amostragem da população de mosquitos. Os 90 quarteirões foram divididos em três grupos de 30 quarteirões, que foram usados ciclicamente, a cada semana. Em cada quarteirão foram instalados os quatro métodos de amostragem distintos em pontos equidistantes, totalizando 120 equipamentos (Figura 10). O período de coleta de mosquitos e larvas totalizou 33 semanas epidemiológicas. As coletas tiveram início na semana epidemiológica 41 (outubro de 2005) e término na semana epidemiológica 21 (maio de 2006).

As ovitrampas (Figura 11-A) foram colocadas no peridomicílio em área sombreada e coberta, fora do alcance de animais, com altura máxima de 1,5 m. Semanalmente, as ovitrampas foram inspecionadas, as palhetas recolhidas e enviadas ao Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (ICB/UFMG) onde foi feita a contagem dos ovos. Estes foram colocados para eclodir e a identificação foi feita a partir das larvas vivas de terceiro e quarto estádios. As larvas foram encaminhadas para o Laboratório de Virologia (ICB/UFMG) para extração de RNA e realização de RT-PCR.

As BG-Trap®s (Figura 11-C) foram instaladas, semanalmente, nos imóveis selecionados onde permaneciam ligadas em baterias de 12 volts por 24 horas. Após este período, foram desarmadas e os sacos coletores de insetos encaminhados, no mesmo dia, para o Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (ICB/UFMG).

O Aspirador de Nasci (Figura 11-D) foi utilizado, semanalmente, nos 30 imóveis selecionados, sempre por 15 minutos em cada imóvel, incluindo peri e intradomicílio. Os insetos coletados foram enviados para o Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (ICB/UFMG).

As MosquiTRAPs (Figura 11-B) permaneceram instaladas nos imóveis selecionados pelo período de uma semana, nos mesmos moldes das ovitrampas. Durante as vistorias, no momento da inspeção, os culicídeos aderidos ao cartão adesivo foram retirados, identificados e os resultados

transferidos para o sistema de computação móvel (Palm). Mensalmente, os cartões e os atraentes eram substituídos. Todas as vistorias foram assinaladas nos “Palms” e os dados foram sincronizados ao computador do Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores e enviados para a Ecovec. Os resultados foram repassados, semanalmente, para a Gerência de Controle de Zoonoses e para a equipe do Centro de Saúde Serrano.

Os espécimes de *Aedes* capturados foram mantidos em congelador por até no máximo 24 horas e então encaminhados para o Laboratório de Virologia (ICB/UFMG) para extração de RNA e PCR. Apenas os abdomens das fêmeas ficaram no Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores para estudos da biologia desses insetos.



Figura 9 – Área de coleta de ovos e mosquitos de *Aedes* no Bairro Serrano, Belo Horizonte (MG). No mapa da área trabalhada, estão marcados em cores distintas (rosa, salmão e amarelo), os conjuntos de 30 quarteirões utilizados a cada semana, para instalação dos métodos de amostragem, totalizando os 90 quarteirões selecionados para o estudo, no bairro Serrano.

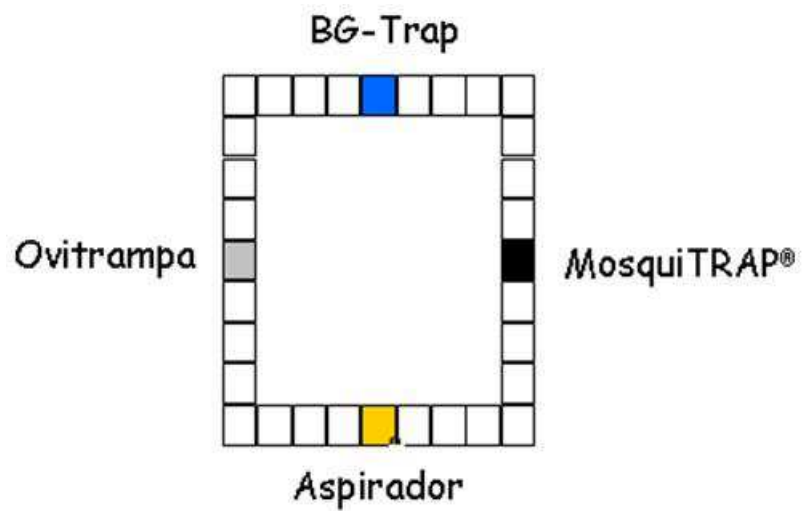


Figura 10 - Esquema de disposição dos métodos de amostragem nos quarteirões: Aspirador de Nasci , BG-Trap®, MosquiTRAP e Ovitampa .



A) Ovitrapa



B) MosquiTRAP



C) BG-Trap®



D) Aspirador de Nasci

Figura 11: Tipos de métodos de amostragem utilizados no presente trabalho para captura de ovos e adultos de *Aedes aegypti*.

2. EXTRAÇÃO DE RNA DE LARVAS DE MOSQUITOS E DE MOSQUITOS ADULTOS (Boom *et al*, 1990) E KIT COMERCIAL DE EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL QIAGEN

Os mosquitos coletados foram identificados por sexo, local de coleta (quarteirão), método de amostragem e semana epidemiológica. Após eclosão dos ovos coletados, as larvas foram identificadas segundo local de coleta, armadilha e semana epidemiológica. Após identificação, foram acondicionados em tubos cônicos de 1,5 mL e mantidos a -70°C.

Para a extração de RNA total, foram formados “pools” de até 20 mosquitos e “pools” de até 50 larvas tendo por critério o sexo, o tipo de método de amostragem e a semana epidemiológica. As larvas e mosquitos presentes nos “pools” foram macerados com micropistilo, em 300 ul de meio Leibowitz-15 (L-15) (GIBCO BRL®, USA), contendo 50 µg/mL de gentamicina, 2 µg/mL de fungizona, 100 U/mL de penicilina. Os macerados foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos, a 4°C (Sorvall RT-6000 B) e 200 ul do sobrenadante foram congelados a -70°C para futuro isolamento viral.

Para a padronização da extração do RNA das amostras, foram testados três métodos: kit comercial Qiamp viral da Qiagen (Q) e dois protocolos de extração de RNA total, de acordo com Boom *et al.* (1990), um apresentando pequenas diferenças em relação ao protocolo original, Boom modificado e o protocolo original, Boom original.

Para a extração com o kit comercial da QIAGEN foi seguido o protocolo indicado pelo fabricante e utilizados 140 ul do sobrenadante dos macerados de larvas e mosquitos.

Para o protocolo de Boom original, aos 100 ul restantes de sobrenadante foram acrescentados 900 ul de tampão de lise (60g de isotiocianato de guanidina, 50 mL de TRIS 0,1M pH 6,4, 11mL de 0,2 M EDTA pH 8,0, 1,3 mL de Triton X-100), seguido por agitação durante uma hora. A essa mistura foram acrescentados 50 ul de solução de sílica que foi homogeneizada por dois minutos. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 ul de solução de lavagem (60g isotiocianato de guanidina, 50 mL de TRIS 0,1 M pH 6,4). Novamente, o precipitado foi lavado duas vezes com 500 ul de etanol 70%. O precipitado foi lavado com 500 ul de acetona e centrifugado a 3000 rpm por 2

minutos. Após a evaporação da acetona, por 10 minutos a 56°C, foram adicionados 40µl de Tampão de Eluição (10 mM TRIS, 1 mM de EDTA) e aquecidos a 56°C por 10 minutos. Após homogeneização, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -70°C.

Para o protocolo de Boom modificado, foram utilizados 60 ul de sobrenadante, aos quais foram adicionados 200 ul de tampão de lise (60g de isotiocianato de guanidina, 50 mL de TRIS 0,1M pH 6,4, 11mL de 0,2 M EDTA pH 8,0, 1,3 mL de Triton X-100) e 50 ul de solução de sílica. A solução foi homogeneizada por 30 segundos e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 200 ul de solução de lavagem (60g isotiocianato de guanidina, 50 mL de TRIS 0,1 M pH 6,4). Novamente, o precipitado foi lavado duas vezes com 500 ul de etanol 70%. O precipitado foi lavado com 500 ul de acetona e centrifugado a 3000 rpm por 2 minutos. Após a evaporação da acetona, a temperatura ambiente, foram adicionados 40µl de Tampão de Eluição (10 mM TRIS, 1 mM de EDTA). Após homogeneização, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -70°C.

3. SÍNTESE DE cDNA

Para produção de DNA complementares (cDNAs), cerca de 1 a 5 µg de RNA extraído foi incubado a 70°C, por 5 minutos, juntamente com o iniciador anti-senso **D2**: 5'TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TC 3' (Lanciotti *et al.*, 1992). Após incubação em banho de gelo, foram adicionados à reação: 5 µl de tampão de RT-PCR 5X (20 mM TRIS-CL pH 8,4, 50 mM KCL), 1 µl de dNTPs (10mM), 1 µl de enzima M-MLV RT (200U/µl) (Promega Corporation-USA) e 7ul de H₂O. Essa mistura foi incubada por 60 minutos a 42°C, posteriormente a 70°C por 15 minutos, sendo então resfriada em banho de gelo. O cDNA obtido foi mantido a -20 °C.

Empregando o método de extração de RNA descrito por Boom *et al.* (1990), foi feito o teste de sensibilidade da técnica de RT-PCR nas nossas condições de trabalho. Foram utilizados mosquitos e larvas não infectados, obtidos do insetário do Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, e a

estes foram acrescentados concentrações variadas, de 0,1 a 50 mil PFU de uma amostra de DENV-2, obtida por multiplicação em células C6-36 no laboratório de Virologia (ICB/UFMG).

4. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE - PCR

Para a amplificação do gene **C-prM** de DV, foram utilizados 2,5 µl de cDNA, 2,5 µl de tampão 10X, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador **D2** e **D1** - 5'TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA G 3'(Lanciotti *et al*, 1992), 2 µl de MgCl₂ (2,5 mM), 1 µl de dNTP's (10 mM) (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1 µl de Taq polimerase (Promega) (5U/µl) e H₂O ultra pura q.s.p. 25µl.

As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer Cetus (Perkin, USA) modelo 2400, seguindo as seguintes variações de temperatura: uma desnaturação inicial 94°C, por 5 minutos; seguida de 30 ciclos de desnaturação 94°C, por 55 segundos; pareamento 55°C por 50 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos.

a. PCR "SEMI-NESTED"

Para melhorar a especificidade e sensibilidade da PCR, foi desenhado um iniciador novo, a partir do iniciador senso de Lanciotti *et al.* (1992). A sequência do iniciador denominado DEN 1F é 5'- CGA GAA ACC GCG TGT CAA C -3'. Esse iniciador gera um fragmento de 490pb que é menor que o gerado pelos iniciadores externos de Lanciotti *et al.*, (1992) (511pb). Todas as amostras foram analisadas com o novo iniciador desenhado e o iniciador anti-senso de Lanciotti *et al.* (1992).

O desenho deste foi feito com o auxílio dos programas OLIGO 4.0. Durante o desenho do iniciador, foram analisados parâmetros como temperatura de pareamento, formação de dímeros, conteúdo de CG e AT.

As condições da reação de PCR Semi-Nested seguiram as mesmas condições utilizadas na primeira reação de PCR.

b. FRACIONAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O produto de PCR foi fracionado em gel de poliacrilamida 8% (1,86 mL de acrilamida/bis (29:1), 1,40 mL de Tris/Borato/EDTA (TBE), 10% de persulfato de amônio (PSA), 7 µl de TEMED e 3,74 mL de H₂O). O fracionamento foi feito a 100 volts por 1 hora, em tampão de corrida TBE 1X (0,089M TRIS-ACETATO, 0,089M ácido bórico, 0,002M EDTA). Para a coloração, foi empregado o método com o nitrato de prata conforme o protocolo de coloração descrito pela BIORAD: os géis foram fixados em solução fixadora A (40% metanol, 10% ácido acético, v/v) e solução fixadora B (10% etanol, 5% ácido acético v/v). Após incubação com solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M, ácido nítrico 0,032 M) por 5 minutos, os géis foram corados com nitrato de prata (0,6 g/300 mL de água) por 20 minutos. Em seguida, os géis foram lavados com água deionizada por 1 minuto, acrescentando-se a solução reveladora (5,9 g de carbonato de sódio, 0,1 g de paraformaldeído) por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido acético 5%.

c. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

O DNA dos produtos de PCR foi purificado usando o protocolo de purificação com reagente contendo 20% de PEG 8000 em solução de NaCl 2,5M. Ao volume do produto de PCR, foi adicionado o mesmo volume de PEG 8000, e foi incubado por 15 minutos a 37°C. Após incubação, o produto foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado totalmente. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70%, gelado, centrifugando por dois minutos a 14000 rpm. Todo o sobrenadante foi descartado para secagem do sedimento. Para eluição do DNA, foi adicionado 8ul de água deionizada, homogeneizando por 15 segundos e foi incubado, novamente, por 15 minutos a 37°C. Após purificação, as amostras foram quantificadas no “nanodrop” (NanoDrop[®], ND-1000 Spectrophotometer, USA).

d. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE DNA

O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi descrito por Sanger *et al.*, (1977) em seqüenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando o Kit *Dy Enamic ET Dye Terminator*

Cycle Sequencing Kit for Megabace e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Para cada fragmento foram feitas três reações de sequenciamento, em ambas orientações. As seqüências obtidas foram sobrepostas e a seqüência final editada utilizando o programa CAP3 (Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)).

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Alignment Tool, Altsuchl *et al*, 1990 1997?). As seqüências nucleotídicas foram analisadas pelo programa BLAST N e as seqüências inferidas de aminoácidos foram analisadas pelo programa BLAST X. As seqüências de nucleotídeos e seqüências inferidas de aminoácidos foram analisadas com o auxílio dos programas:

- Clustal W “Multiple Sequence Alignment” (Thompson *et al.*, 1994). (<http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu>); Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin.html>). LALIGN ([http://ch.embnet.org/software/LALIGN form.html](http://ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)), TRANSLATE (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>).

RESULTADOS

1. COLETA DE MOSQUITOS E LARVAS DE *Ae. aegypti* NOS DIFERENTES MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

Durante o período de estudo, foram coletados um total de 789 fêmeas e 465 machos. Dos mosquitos coletados, 370 fêmeas e 21 machos foram coletados pela MosquiTRAP, 275 fêmeas e 300 machos foram coletados pela BG-Trap®, e 144 fêmeas e 144 machos foram coletados pelo Aspirador de Nasci, conforme representado na figura 12.

O número de fêmeas coletadas pela MosquiTRAP foi maior do que o número de machos enquanto que o número de machos coletados pela BG-Trap® foi um pouco maior que o número e fêmeas coletadas.

O número de ovos coletados pela Ovitampa, no mesmo período, foi de 76.120 e destes ovos eclodiram 32.346 larvas. A figura 13 apresenta o número de ovos coletados e eclodidos nas semanas epidemiológicas 41 a 21.

2. PROCESSAMENTO DOS MOSQUITOS E LARVAS

Como não houve instalação dos métodos de amostragem na semana epidemiológica 9, devido a falta de carro para transportar os agentes de campo, foram feitas coletas em 32 semanas epidemiológicas. A tabela 1 mostra o número de mosquitos e ovos coletados nas 32 semanas epidemiológicas.

Na BG-Trap® foi capturado o maior número de mosquitos (575 mosquitos), quando comparada aos outros dois métodos de amostragem, MosquiTRAP (391) e Aspirador de Nasci (288). A coleta de mosquitos foi maior nas semanas epidemiológicas 48 (43 mosquitos), 51 (72 mosquitos), 52 (41 mosquitos), 12 (97 mosquitos) e 20 (78 mosquitos). A coleta de ovos foi maior nas semanas epidemiológicas 7 (2.627 larvas) e 17 (2.227 larvas).

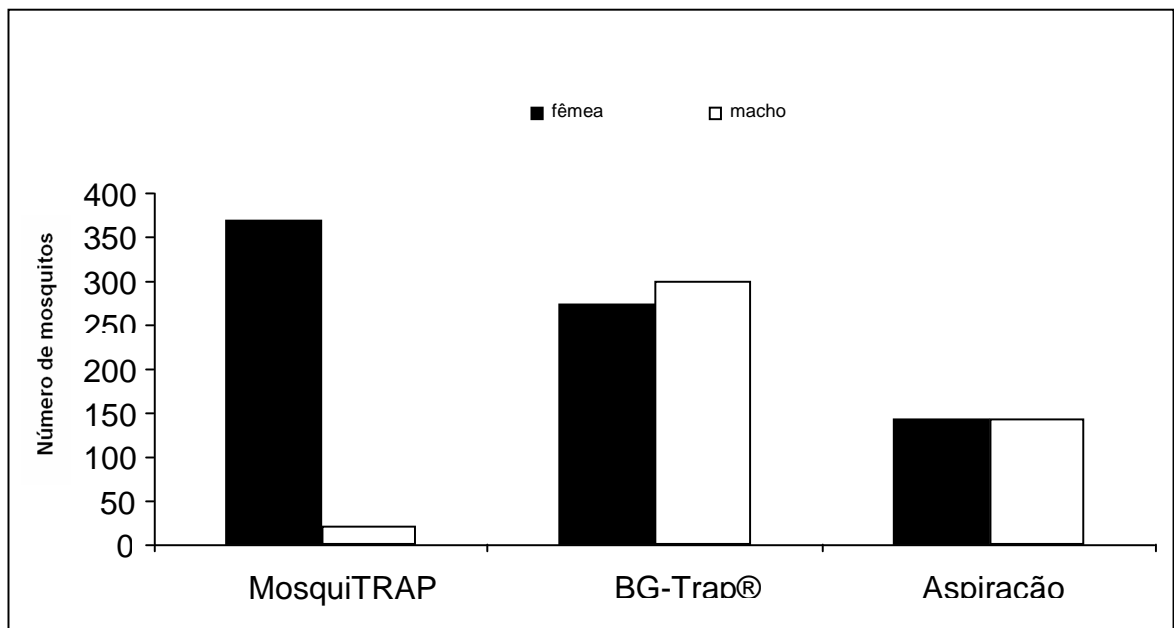


Figura 12 - Número de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* capturados em três dos quatro tipos de metodologia de amostragem empregadas neste estudo.

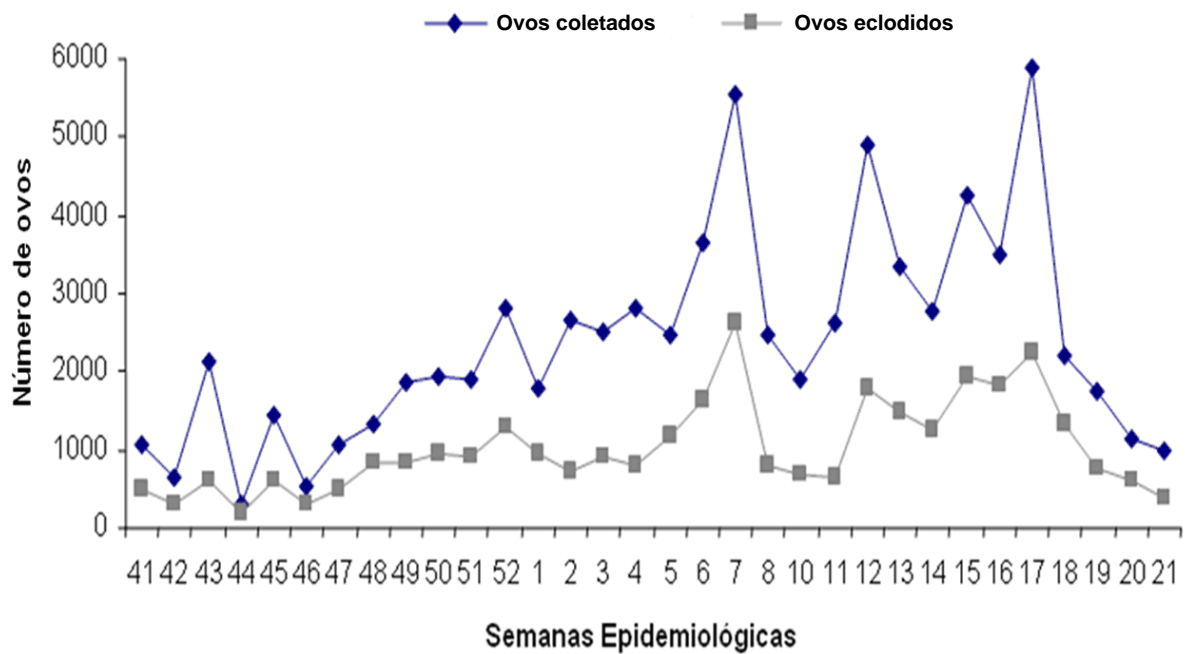


Figura 13 – Número de ovos coletados em Ovitrapa e número dos ovos eclodidos, nas semanas epidemiológicas 41/2005 a 21/2006.

Tabela 1 – Número de mosquitos e ovos coletados nas 32 semanas epidemiológicas (outubro de 2005 a maio de 2006) no Bairro Serrano, Belo Horizonte, MG.

Semanas Epidemiológicas	BG-Trap®		MosquiTRAP		Aspirador de Nasci		Ovitampa	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Ovos	Larvas
41	3	5	2	1	0	3	1048	506
42	0	0	2	4	0	1	632	320
43	1	0	3	0	3	9	2144	600
44	9	13	0	0	0	2	304	204
45	0	0	7	1	0	0	1437	589
46	1	0	3	1	3	3	543	300
47	7	3	6	0	1	0	1074	509
48	12	17	9	1	1	3	1324	820
49	5	5	8	1	0	1	1859	840
50	12	13	5	0	1	1	1929	932
51	20	21	31	0	0	0	1881	925
52	8	6	23	4	0	0	2817	1290
1	17	13	11	0	0	0	1774	934
2	14	17	15	1	0	1	2646	714
3	12	17	6	4	0	1	2521	894
4	9	1	6	-	0	0	2813	801
5	12	14	10	-	1	0	2452	1183
6	8	16	6	1	0	1	3656	1640
7	13	21	11	-	0	0	5559	2627
8	3	7	19	-	1	0	2477	811
10	17	38	7	-	0	0	1894	692
11	12	23	12	-	13	7	2607	651
12	15	11	28	-	26	17	4906	1793
13	18	13	16	1	8	9	3333	1481
14	9	3	23	-	18	19	2768	1251
15	3	2	30	1	9	8	4252	1922
16	8	4	9	-	10	11	3506	1828
17	1	-	24	-	15	11	5902	2227
18	11	5	4	-	3	8	2204	1320
19	2	2	11	-	2	0	1728	744
20	8	5	10	-	27	28	1157	617
21	5	5	13	-	2	0	973	381
TOTAL	275	300	370	21	144	144	76120	32346

Foram analisadas por PCR as amostras da primeira semana epidemiológica de cada mês coletado. As semanas selecionadas foram: 41, 44, 48, 01, 05, 10, 13 e 18. A Tabela 2 mostra o número de mosquitos e larvas analisados nestas semanas epidemiológicas.

3. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR RT-PCR

a. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA

A figura 14 mostra a fotografia de um gel de poliacrilamida, onde o fracionamento do DNA amplificado na RT-PCR, utilizando o par de iniciadores de Lanciotti e colaboradores (1992), a partir do RNA extraído por três métodos pode ser observado. Houve diferença na quantidade de DNA amplificado a partir do RNA extraído seguindo o protocolo original descrito por Boom e colaboradores (1990), sendo o mais eficiente. O método de escolha utilizado nos demais experimentos foi o de Boom original.

b. TESTE DE SENSIBILIDADE DA RT-PCR-“SEMI-NESTED”

O teste de sensibilidade foi feito contaminando macerados de mosquitos e larvas com vírus, nas concentrações de 500 a 0,01 PFU. O par de iniciadores utilizados foi o D2 e o DEN 1F. De acordo com o observado na figura 15, até 0,01 PFU de vírus pode ser detectado na amplificação. Quando as amostras foram contaminadas com concentrações de vírus maiores que 0,01 PFU, pode ser observada uma amplificação proporcional à concentração. Não houve amplificação no controle negativo.

Tabela 2 – Número de mosquitos e larvas analisados por RT-PCR

Semanas epidemiológicas 2005-2006	BG-Trap®		MosquiTRAP		Aspirador de Nasci		Ovitampa
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Larvas
41	-	-	3	2	-	2	483
44	1	-	-	-	-	2	198
48	12	17	8	1	1	3	760
01	-	-	-	-	-	-	665
05	12	13	8	-	1	-	1076
10	16	36	3	-	-	-	754
13	14	11	12	1	8	9	1004
18	11	15	4	-	3	8	1298
TOTAL	66	92	38	4	13	24	6238

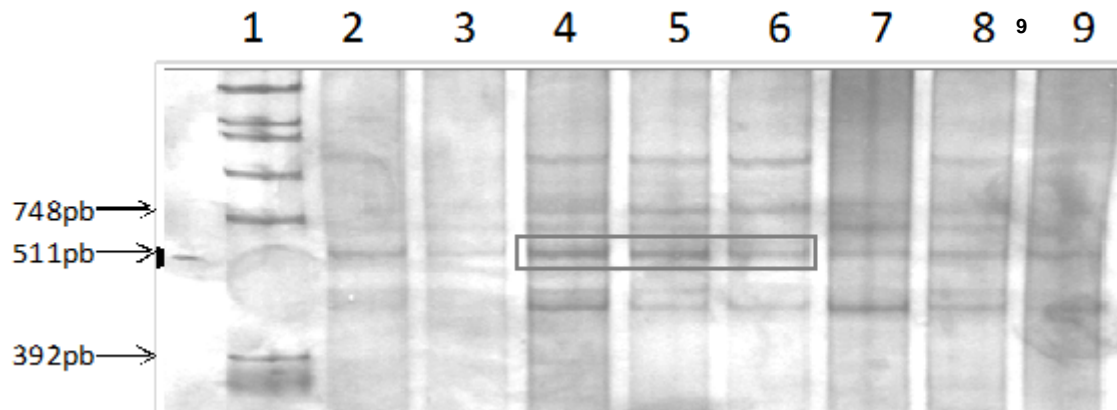


Figura 14 - Comparação dos métodos de extração de RNA para amplificação da região genômica C-prM de *Flavivirus*. Amostras de larvas e mosquitos fêmeas e machos de *Ae. aegypti* foram macerados em meio L-15 e acrescidos de DENV 2. 100ul da amostra foi utilizado para a extração de RNA para os protocolos de BOOM e 140ul para o kit da Qiagen. O RNA extraído foi empregado na RT-PCR e o amplificado foi fracionado a 100 volts em PAGE 8%, corado pela prata. Canaleta 1 - Padrão de tamanho molecular; Canaletas 2 e 3 - Kit da Qiagen (vírus + larvas de *Ae. aegypti* e vírus + fêmeas de *Ae. aegypti*, respectivamente). Canaletas 4, 5 e 6 Protocolo BOOM original (vírus + larvas de *Ae. aegypti*; vírus + fêmeas de *Ae. aegypti* e vírus + machos de *Ae. aegypti*, respectivamente). Canaletas 7, 8 e 9 - Protocolo BOOM modificado (vírus + larvas de *Ae. aegypti*; vírus + fêmeas de *Ae. aegypti* e vírus + machos de *Ae. aegypti*, respectivamente).

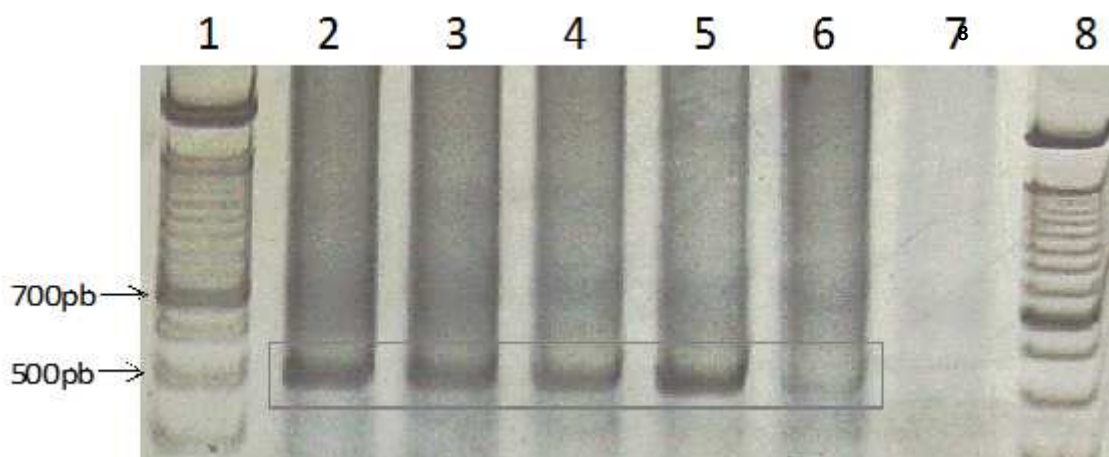


Figura 15 - Teste de sensibilidade de detecção do genoma viral pela técnica de RT-PCR-“Semi-Nested”. Amostras de mosquitos e larvas foram maceradas com meio L-15 e acrescidas de diluições seriadas de DENV 2, e submetidas à extração de RNA, seguindo o protocolo de BOOM original, seguida de RT-PCR. Os amplificados foram fracionados a 100 volts em PAGE 8%, corado pela prata. Canaleta 1 - Padrão de tamanho molecular; Canaletas 2 a 6 - Diluições seriadas de 500, 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 PFUs, respectivamente; Canaleta 7 - Controle negativo; Canaleta 8 – Padrão de tamanho molecular.

c. DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENOMA VIRAL NAS AMOSTRAS DE MOSQUITOS E LARVAS

Para a detecção do genoma viral nas amostras coletadas, foram utilizadas as técnicas moleculares RT-PCR e “Semi-Nested”-PCR, usando nesta última, o iniciador senso desenhado (D1.1) e o iniciador anti-senso (D2) de Lanciotti *et al.* (1992). A reação gera um fragmento de 490pb, 21pb menor que o fragmento gerado com os dois iniciadores (D1 e D2) de Lanciotti *et al.* (1992). A figura 16 mostra a amplificação do genoma viral em amostras de mosquitos fêmeas e machos, capturados pela BG-Trap® e numa amostra de mosquitos machos capturados pelo Aspirador de Nasci. As amostras são pools de mosquitos das semanas epidemiológicas 10 e 18, respectivamente.

Do total de amostras (mosquitos adultos) coletadas, foram formados 31 “pools”, sendo 17 “pools” de fêmeas e 14 pools de machos. A figura 17 apresenta o gráfico com o número total dos “pools” de fêmeas de *Ae. aegypti* analisados e o número daqueles que se mostraram positivos para a detecção do genoma viral por “Semi-Nested”-PCR. Para a BG-Trap® foram analisados sete “pools” e um foi positivo para o genoma viral (14,3%) e para a MosquiTRAP foram analisados seis “pools” e um foi positivo para o genoma viral (16,6%).

A detecção de genoma viral nos “pools” de machos de *Ae. aegypti* analisados está representada na Figura 18. Para a BG-Trap® foram analisados seis “pools” e um foi positivo para a detecção do genoma viral (14,3%). Para o Aspirador de Nasci foram analisados cinco pools e um foi positivo para a detecção do genoma viral (20%).

A percentagem encontrada para a detecção do genoma viral nos “pools” de larvas de *Ae. aegypti* foi de 13,2% (15 positivos/114 “pools” analisados). A figura 19 apresenta a positividade dos “pools” analisados da Ovitampa para a detecção do genoma viral, nas semanas epidemiológicas selecionadas para análises. A detecção do genoma viral foi encontrada nas semanas epidemiológicas 44, 48, 01, 05 e 18.

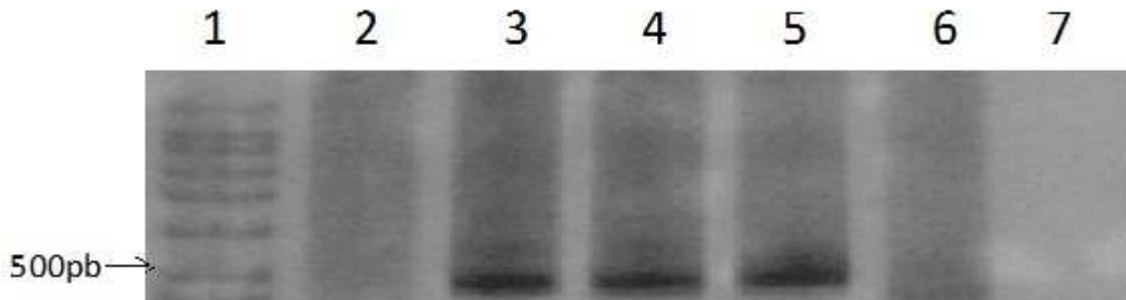


Figura 16 – Amplificação do genoma viral das amostras de mosquitos por RT-“Semi-Nested”-PCR. Amostras de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* foram macerados em meio L-15 e 100ul da amostra foi utilizado para a extração de RNA, seguida de RT-semi-nested PCR. Os amplificados foram fracionados a 100 volts em PAGE 8%, corado pela prata. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular (ladder 50); Canaleta 2 e 3 – Controles positivo e negativo da reação, respectivamente; Canaletas 4 e 5 - Amostras positivas para a detecção do genoma viral, de mosquitos machos e fêmeas, respectivamente, capturados pela BG-Trap®, na semana epidemiológica 10; Canaleta 6 - Amostra negativa para a detecção do genoma viral de mosquitos machos capturados pelo Aspirador de Nasci, na semana epidemiológica 18; Canaleta 7 - Vazia.

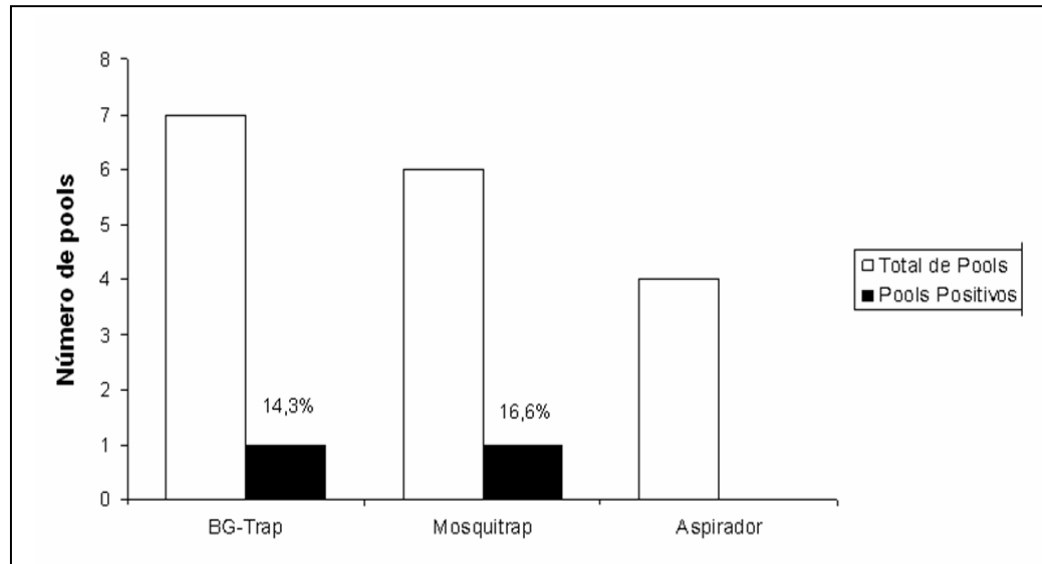


Figura 17 – Detecção do genoma viral, amplificado por “Semi-Nested”-PCR, nos “pools” de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas nos três métodos de amostragem utilizados. Dados referentes à semana epidemiológica 10.

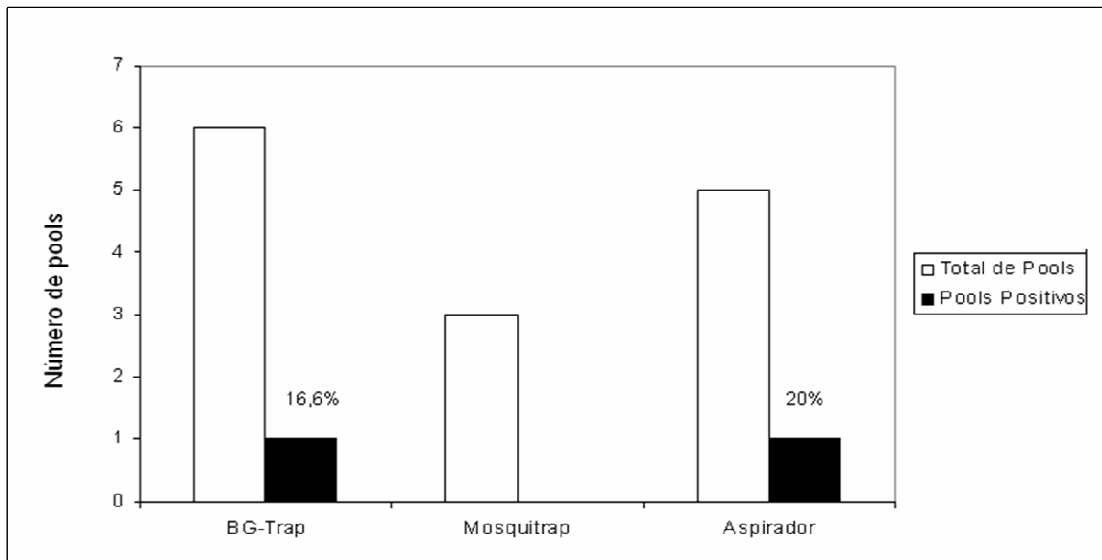


Figura 18 - Detecção do genoma viral, amplificado por “Semi-Nested”-PCR, nos “pools” de mosquitos machos de *Ae. aegypti* capturados nos três métodos de amostragem utilizados. Dados referentes às semanas epidemiológicas 10 (BG-Trap®) e 18 (Aspirador).

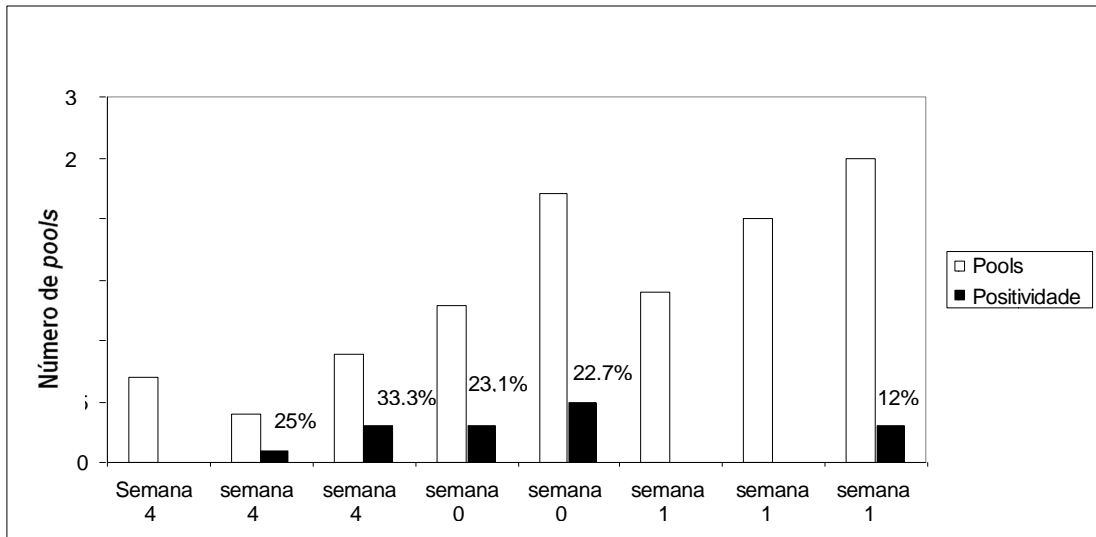


Figura 19 - Detecção do genoma viral, amplificado por “Semi-Nested”-PCR, nos “pools” de larvas analisados. Dados referentes às semanas epidemiológicas 44, 48, 1, 5 e 18, respectivamente.

d. PURIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO PRODUTO OBTIDO POR RT-PCR RELATIVO À REGIÃO DE JUNÇÃO DOS GENES C-prM

O produto obtido por “Semi-Nested”-PCR relativo à região C-prM de algumas amostras foi seqüenciado para caracterizar e genotipar molecularmente as amostras de DENV circulantes na área estudada. Três “pools” de mosquitos adultos e um “pool” de larvas foram seqüenciadas. Embora o presente trabalho tenha apresentado um número maior de “pools” positivos para DV, devido ao tempo escasso, apenas quatro amostras puderam ser analisadas.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, das quatro amostras seqüenciadas, foram alinhadas com a região genômica de DENV-3, genótipo I. A Figura 20, mostra os alinhamentos de nucleotídeos e de aminoácidos das seqüências de parte da região de C-prM das amostras analisadas, com algumas seqüências depositadas no GeneBank, classificadas como genótipo I de DENV3.

As porcentagens de similaridade de nucleotídeos entre o genoma das amostras de mosquitos e larvas variaram entre 95,4% e 98,8%. Já em relação às amostras das Filipinas, China e BH-16 as porcentagens de identidade nucleotídica variaram entre 96,1% e 99,8%. As porcentagens de identidade entre as seqüências de aminoácidos inferidas do genoma de amostras de mosquitos e larvas variaram entre 92,7% e 98,5%. Já com as amostras Filipinas, China e BH-16 as porcentagens de identidade de aminoácidos variaram entre 95,6% e 100% (Tabela 3).

Com base na seqüência de nucleotídeos da região de junção dos genes C-prM foi construída uma árvore filogenética, com isolados de diferentes localidades e genótipos. A árvore apresenta os três genótipos de DENV-3, segundo classificação de Lanciotti *et al.* (1994). O genótipo I inclui isolados do Sudeste Asiático e Ilhas do Pacífico Sul; o genótipo II inclui isolados da Tailândia; e o genótipo III inclui isolados da Sri-Lanka, América Central e Leste da África. As amostras de mosquitos adultos e larvas, positivas para a detecção

(A)

```
#P17_(18)      CTC AGC TTT CTA GCC ATT CCA CCG ACA GCA GGA GTC TTG GCT AGA TGG GGT ACC TTT AAG
#P15_(18)      ... ..A ... ..
#P1_(19)       ... ..A ... ..
#P11_(16)      ... ..A ... ..      A.. ..      .TG ..
#BH-16/2003    ... ..A ... ..
#BH-17/2003    ... ..A ... ..
#BH-19/2003    ... ..A ... ..
#BH-22/2004    ... ..A ... ..
#BH-24/2003    ... ..A ... ..
#BH-25/2003    ... ..A ... ..
#MG-20/2004    ... ..A ... ..
#MG-21/2003    ... ..A ... ..
#PI-52/2006    ... ..A ... ..      .A ..      .T ..      ..A ..      .C ..
#Filipinas/1956  ... ..A ... ..
#Brasil/RO1-02  ... ..A ... ..
#China/1980     ... ..A ... ..
#Brasil/2001    ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Brasil/2002    ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#MG-27/2002    ... ..A ... ..      ..A ..
#Sri-Lanka/2003  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Sleman/1978    ... ..A ... ..      ..A ..
#Indonesia/2004  ... ..A ... ..      ..G ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Indonesia/Tailandia  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Tailandia/1973  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Singapura/2004  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Guatemala/1996  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Guatemala/1997  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#PI-80/2006     ... ..A ... ..      .A ..      .T ..      ..A ..      .C ..
#Guatemala/1998  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Martinica/1999  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..
#Martinica/2000  ... ..A ... ..      .A ..      ..A ..      .C ..

#P17_(18)      AAG TCG GGG GCT ATT AAG GTT TTA AAA GGC TTC AAG AAG GAG ATC TCA AAC ATG CTG AGC
#P15_(18)      ... ..
#P1_(19)       ... ..
#P11_(16)      ... G.. ..C ATC .. ..      .T ..      ..T.T ..      .C G..
#BH-16/2003    ... ..
#BH-17/2003    ... ..
#BH-19/2003    ... ..
#BH-22/2004    ... ..
#BH-24/2003    ... ..
#BH-25/2003    ... ..
#MG-20/2004    ... ..
#MG-21/2003    ... ..
#PI-52/2006    ... ..      .C ..      .C C.G ..
#Filipinas/1956  ... ..      .C ..
#Brasil/RO1-02  ... ..      .C ..
#China/1980     ... ..      .C ..
#Brasil/2001    ... ..      .C ..      .C C.G ..
#Brasil/2002    ... ..      .C ..      .C C.G ..
#MG-27/2002    ... ..
#Sri-Lanka/2003  ... ..      .C ..      .C C.G ..
#Sleman/1978    ... ..      .C C.G .G ..
#Indonesia/2004  ... ..      .C C.G .G ..
#Indonesia/Tailandia  ... ..A ..      .C C..      ..T ..
#Tailandia/1973  ... ..A ..      .C C..      ..T ..
#Singapura/2004  ... ..      .C ..      .C C.T ..
#Guatemala/1996  ... ..      .C ..      .C C.G ..
#Guatemala/1997  ... ..      .C ..      .C C.G ..
#PI-80/2006     ... ..      .C ..      .C C.G ..
#Guatemala/1998  ... ..      .C ..      .C C.G ..
#Martinica/1999  ... ..      .C ..      .C C.G ..
#Martinica/2000  ... ..      .C ..      .C C.G ..
```

	ATT	ATC	AAC	AAA	CGG	AAA	AAG	ACA	TCG	CTC	TGT	CTC	ATG	ATG	ATG	TTA	CCA	GCA	ACA	CTT	
#P17_(18)																					
#P15_(18)
#P1_(19)G
#P11_(16)
#BH-16/2003
#BH-17/2003
#BH-19/2003
#BH-22/2004
#BH-24/2003
#BH-25/2003
#MG-20/2004
#MG-21/2003
#PI-52/2006	..AA	..G	G..
#Filipinas/1956
#Brasil/RO1-02
#China/1980
#Brasil/2001	..AA	..G	G..
#Brasil/2002	..AA	..G	G..
#MG-27/2002
#Sri-Lanka/2003	..A	C..A	..G	G..
#Sleman/1978G
#Indonesia/2004	..CG
#Indonesia/TailandiaA
#Tailandia/1973A
#Singapura/2004	..AA	..G	G..
#Guatemala/1996	..AA	..G	G..
#Guatemala/1997	..AA	..G	G..
#PI-80/2006	..A	C..A	..G	G..
#Guatemala/1998	..AGA	..G	G..
#Martinica/1999	..AA	A..G	G..
#Martinica/2000	..AA	..G	G..
	GCT	TTC	CAC	TTA	ACT	TCA	CGA	GAT	GGA	GAG	CCG	CGC	ATT	ATA	GTG	GGG	AAG	AAT	GGA	AGA	
#P17_(18)																					
#P15_(18)G	..TA
#P1_(19)G	..TA
#P11_(16)G	..TA
#BH-16/2003G	..TA
#BH-17/2003G	..TA
#BH-19/2003G	..TA
#BH-22/2004G	..TA
#BH-24/2003G	..TA
#BH-25/2003G	..TA
#MG-20/2004G	..TA
#MG-21/2003G	..TA
#PI-52/2006GCG	..TA
#Filipinas/1956G	..TA
#Brasil/RO1-02G	..TA
#China/1980G	..TA
#Brasil/2001GG	..TA
#Brasil/2002GG	..TA
#MG-27/2002G	..TA
#Sri-Lanka/2003GG	..TA
#Sleman/1978GG	..TA
#Indonesia/2004GG	..TA
#Indonesia/TailandiaGCG	..TA
#Tailandia/1973GCG	..TCA
#Singapura/2004GG	..TA
#Guatemala/1996GG	..TA
#Guatemala/1997GG	..TA
#PI-80/2006GG	..TA
#Guatemala/1998GG	..TA
#Martinica/1999GG	..TA
#Martinica/2000GG	..TA

```

#P17_(18)      GGA AAA TCC CTA CTT TTT AAG ACA GCC TCT GGA ATC AAC ATG TGC ACA CTC ATA GCC ATG
#P15_(18)      ... ..C.
#Pl_(19)       ...
#P11_(16)      ...
#BH-16/2003    ...
#BH-17/2003    ...
#BH-19/2003    ...
#BH-22/2004    ...
#BH-24/2003    ...
#BH-25/2003    ...
#MG-20/2004    ...
#MG-21/2003    ...
#PI-52/2006    ...
#Filipinas/1956 ...
#Brasil/RO1-02 ...
#China/1980    ...
#Brasil/2001    ...
#Brasil/2002    ...
#MG-27/2002    ...
#Sri-Lanka/2003 ..T
#Sleman/1978   ...
#Indonesia/2004 ...
#Indonesia/Tailandia ..G
#Tailandia/1973 ..G
#Singapura/2004 ...
#Guatemala/1996 ...
#Guatemala/1997 ...
#PI-80/2006    ...
#Guatemala/1998 ...
#Martinica/1999 ...
#Martinica/2000 ...

```

```

#P17_(18)      GAT TTG GGA GAG ATG TGT GAT GAC ACG GTC ACT TAC AAA TGC CCC CTC ATT A
#P15_(18)      ... .C.
#Pl_(19)       ...
#P11_(16)      ...
#BH-16/2003    ...
#BH-17/2003    ...
#BH-19/2003    ...
#BH-22/2004    ...
#BH-24/2003    ...
#BH-25/2003    ...
#MG-20/2004    ...
#MG-21/2003    ...
#PI-52/2006    ..C
#Filipinas/1956 ...
#Brasil/RO1-02 ...
#China/1980    ...
#Brasil/2001    ..C
#Brasil/2002    ..C
#MG-27/2002    ...
#Sri-Lanka/2003 ...
#Sleman/1978   ...
#Indonesia/2004 ...
#Indonesia/Tailandia ..C
#Tailandia/1973 ..C
#Singapura/2004 ...
#Guatemala/1996 ..C
#Guatemala/1997 ...
#PI-80/2006    ..C
#Guatemala/1998 ..C
#Martinica/1999 ..C
#Martinica/2000 ..C

```

(B)

#P17_(18)	SRGLLNQGP	MKLVMAFIAF	LSFLAIPPTA	GVLARWGTFK	KSGAIKVLKG	FKKEISNMLS
#P15_(18)	.K.....R.....
#P1_(19)R.....
#P11_(16)R.....	R..M.....	.A.I.....Y..G
#BH-16/2003R.....
#BH-17/2003R.....
#BH-19/2003R.....
#BH-22/2004R.....
#BH-24/2003R.....
#BH-25/2003R.....
#MG-20/2004R.....
#MG-21/2003R.....
#PI-52/2006	.K.....R.....
#Filipinas/1956R.....
#Brasil/RO1-02R.....
#China/1980R.....
#Brasil/2001	.K.....R.....
#Brasil/2002	.K.....R.....
#MG-27/2002R.....	.I.....
#Sri-Lanka/2003	.K.....R.....
#Sleman/1978R.....R.....
#Indonesia/2004R.....	.I.....R.....
#Indonesia/TailandiaR.....
#Tailandia/1973R.....
#Singapura/2004	.K.....R.....
#Guatemala/1996	.K.....R.....
#Guatemala/1997	.K.....R.....
#PI-80/2006	.K.....R.....
#Guatemala/1998	.K.....R.....
#Martinica/1999	.K.....R.....
#Martinica/2000	.K.....R.....
#P17_(18)	IINKRKKTSL	CLMMMLPATL	AFHLTSRDGE	PRIIVGKNR	GKSLLFKTAS	GINMCTLIAM
#P15_(18)M....E.S.....
#P1_(19)R.....M....E.
#P11_(16)M....E.
#BH-16/2003M....E.
#BH-17/2003M....E.
#BH-19/2003M....E.
#BH-22/2004M....E.
#BH-24/2003M....E.D.....
#BH-25/2003M....E.
#MG-20/2004M....E.
#MG-21/2003M....E.
#PI-52/2006I..A.M....E.
#Filipinas/1956M....E.
#Brasil/RO1-02M....E.
#China/1980M....E.
#Brasil/2001I..A.M....E.
#Brasil/2002I..A.M....E.
#MG-27/2002M....E.
#Sri-Lanka/2003Q.....I..A.M....E.
#Sleman/1978R.....M....E.
#Indonesia/2004R.....M....E.
#Indonesia/TailandiaM....E.
#Tailandia/1973M....E.
#Singapura/2004I..A.M....E.
#Guatemala/1996I..A.M....E.
#Guatemala/1997I..A.M....E.
#PI-80/2006L..A.M....E.
#Guatemala/1998R.....I..A.M....E.
#Martinica/1999IM..A.M....E.
#Martinica/2000I..A.M....E.

```

#P17_(18)          DLGEMCDDTV TYKCPLI
#P15_(18)          .S.....P.
#P1_(19)           .....
#P11_(16)          .....H.
#BH-16/2003        .....H.
#BH-17/2003        .....H.
#BH-19/2003        .....H.
#BH-22/2004        .....H.
#BH-24/2003        .....H.
#BH-25/2003        .....H.
#MG-20/2004        .....H.
#MG-21/2003        .....H.
#PI-52/2006        .....H.
#Filipinas/1956    .....H.
#Brasil/RO1-02     .....H.
#China/1980         .....H.
#Brasil/2001        .....H.
#Brasil/2002        .....H.
#MG-27/2002        .....H.
#Sri-Lanka/2003    .....H.
#Sleman/1978       .....
#Indonesia/2004     .....
#Indonesia/Tailandia .....
#Tailandia/1973    .....H.
#Singapura/2004    .....H.
#Guatemala/1996    .....H.
#Guatemala/1997    .....H.
#PI-80/2006        .....H.
#Guatemala/1998    .....H.
#Martinica/1999    .....H.
#Martinica/2000    .....H.

```

Figura 20 - Alinhamento da sequência de nucleotídeos (A) e inferência de aminoácidos (B) da região de junção dos genes C-prM do genoma de DENV detectado por “Semi-Nested”-PCR: P11; P15; P17 e P1 com outras seqüências de *Dengue virus 3* depositadas no GenBank (AY662691, EF428575, AB038466, AB038472, AB038470, AB038479, AY099339, AY099337, AY679147, AY038605, AY099336, AY923865, AY648961, AY858041, M93130, AF317645, EF428575, EF428567, EF428574, EF428572, EF428568, EF428571, EF428570). A sequência nucleotídica (A) e de aminoácido inferida (B) foram comparadas com a região correspondente aos nucleotídeos 157 a 639 e aos aminoácidos 1 a 168 da região de junção dos genes C-prM. As seqüências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL W. As posições dos nucleotídeos estão exibidas em relação à seqüência AY679147 (amostra brasileira do Estado do Rio de Janeiro 2002). (.) indica identidade de nucleotídeos ou aminoácidos.

Tabela 3 - Identidade de nucleotídeos e de aminoácidos entre as seqüências da região de junção dos genes C-prM de amostras de mosquitos adultos e larvas de *Dengue virus 3*, do Brasil (Belo Horizonte), da China e das Filipinas.

Os valores azuis representam as porcentagens de similaridade de aminoácidos. Os valores vermelhos representam a porcentagem de similaridade de nucleotídeos.

Amostras	P17	P15	P1	P11	Filipinas	China	BH-16
P 17		94,9%	97,1%	92,7%	97,1%	97,1%	97,1%
P15	98,1%		96,4%	92,7%	97,1%	97,1%	97,1%
P1	98,8%	98,8%		94,2%	98,5%	98,5%	98,5%
P11	95,4%	95,6%	96,1%		95,6%	95,6%	95,6%
Filipinas	98,5%	98,8%	99,3%	96,4%		100%	100%
China	98,3%	98,5%	99%	96,1%	99,8%		100%
BH-16	98,8%	99%	99,5%	96,6%	99,8%	99,5%	

do genoma de DENV, ficaram agrupadas com amostras recentemente isoladas no Estado de Minas Gerais, com amostras das Filipinas e da China, as quais pertencem ao genótipo I (Figura 21).

4. MAPAS DE CO-LOCALIZAÇÃO

Para tentar melhorar a compreensão dos dados obtidos no presente estudo, foram gerados cinco mapas esquemáticos do bairro Serrano, contendo os 90 quarteirões selecionados, discriminando os três grupos de 30 quarteirões, através de três cores distintas: amarelo, rosa e salmão. Cada cor também corresponde às semanas epidemiológicas analisadas. Os mapas também apresentam os casos de FD notificados e confirmados, com sua localização geográfica (+). Os resultados obtidos para a presença de DENV para os quatro tipos de métodos de amostragem utilizados, foram acrescentados, separadamente, em quatro dos cinco mapas gerados. O último mapa consta com os resultados de todos os tipos de amostragem.

Para a construção dos mapas esquemáticos, a Secretaria de Saúde de Belo Horizonte cedeu, gentilmente, um mapa com a localização e as datas dos casos confirmados de FD (Figura 22).

Na figura 23, são apresentados os dados obtidos com a coleta da Ovitrapa. Os “pools” analisados que foram negativos para amplificação do genoma de DENV estão representados com estrelas vermelhas. Os pools analisados e positivos para DENV, que foram formados misturando amostras de mais de um quarteirão, estão representados com estrelas pretas e rosas, portanto, número de estrela pretas e rosas não corresponde ao número de “pools” mas aos quarteirões de onde vieram as amostras. As estrelas pretas representam os quarteirões possivelmente positivos em apenas uma semana epidemiológica, e as estrelas rosas representam os quarteirões possivelmente positivos em duas semanas epidemiológicas. Os “pools” analisados que representavam um único quarteirão, e que estavam positivos para a amplificação de DENV, estão representados por círculos azuis.

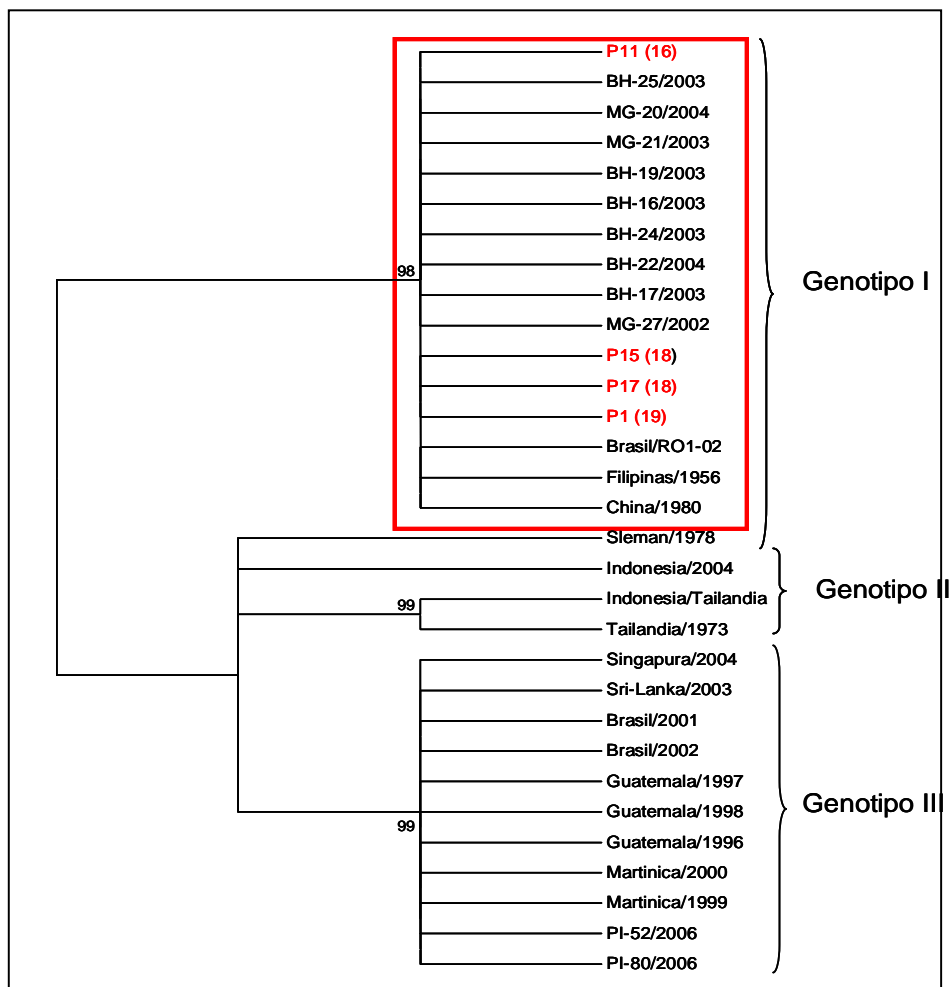


Figura 21 - Árvore filogenética de DENV construída com seqüências da região de junção dos genes C-prM. As seqüências foram obtidas do GenBank, com os seguintes números de acessos: Guatemala 1996 (AB038466); Guatemala 1997 (AB098470); Guatemala 1998 (AB038479); Martinica 2000 e 1999 (AY099339 e AY099337); Brasil 2002 (AY679147); Brasil 2001 (AY038605); Singapura (AY662691); Sri-Lanka 2003 (AY099336); Indonésia e Tailândia 1994 (AY923865); Sleman 1978 (AY648961); Indonésia 2004 (AY858041); Filipinas 1956 (M93130); China 2000 (AF317645); Brasil ROI-02 2002 (EF629371); BH-16 (EF428575); BH-17 (EF428567); BH-19 (EF428574); BH-24 (EF428570); BH-22 (EF428571); BH-25 (EF428569); MG-20 (EF428572); MG-21 (EF428568); MG-27 (EF428573); PI-52 e PI-80 (isoladas de amostras de pacientes com FHD e FD, respectivamente, no Estado do Piauí). A filogenia foi estabelecida pelo método de “Neighbor joining” utilizando o modelo de substituições de nucleotídeos de Tamura Nei implementado no programa MEGA3. Caixa vermelha indica amostras do Estado de Minas Gerais, Filipinas e China.

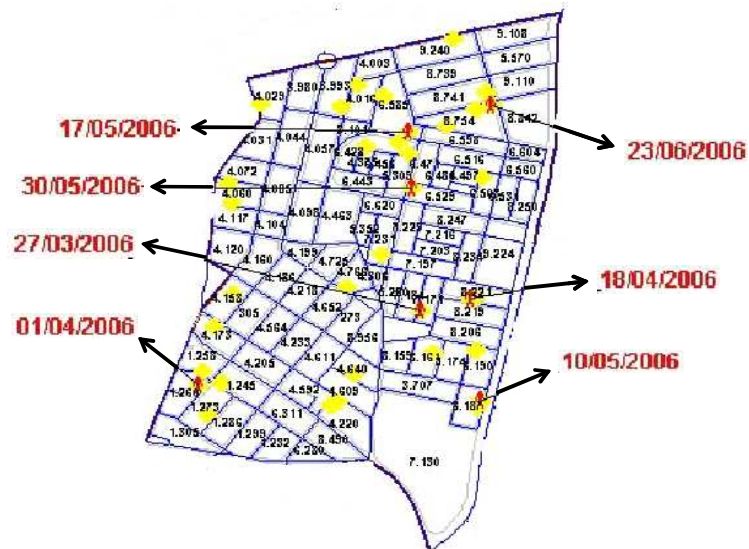


Figura 22 – Mapa esquemático do bairro Serrano, apresentando os casos de FD confirmados, em local e datas determinados. Em amarelo, estão os casos indentificados registrados no período do estudo. Em vermelho, estão os casos confirmados e as datas de registro dos mesmos.

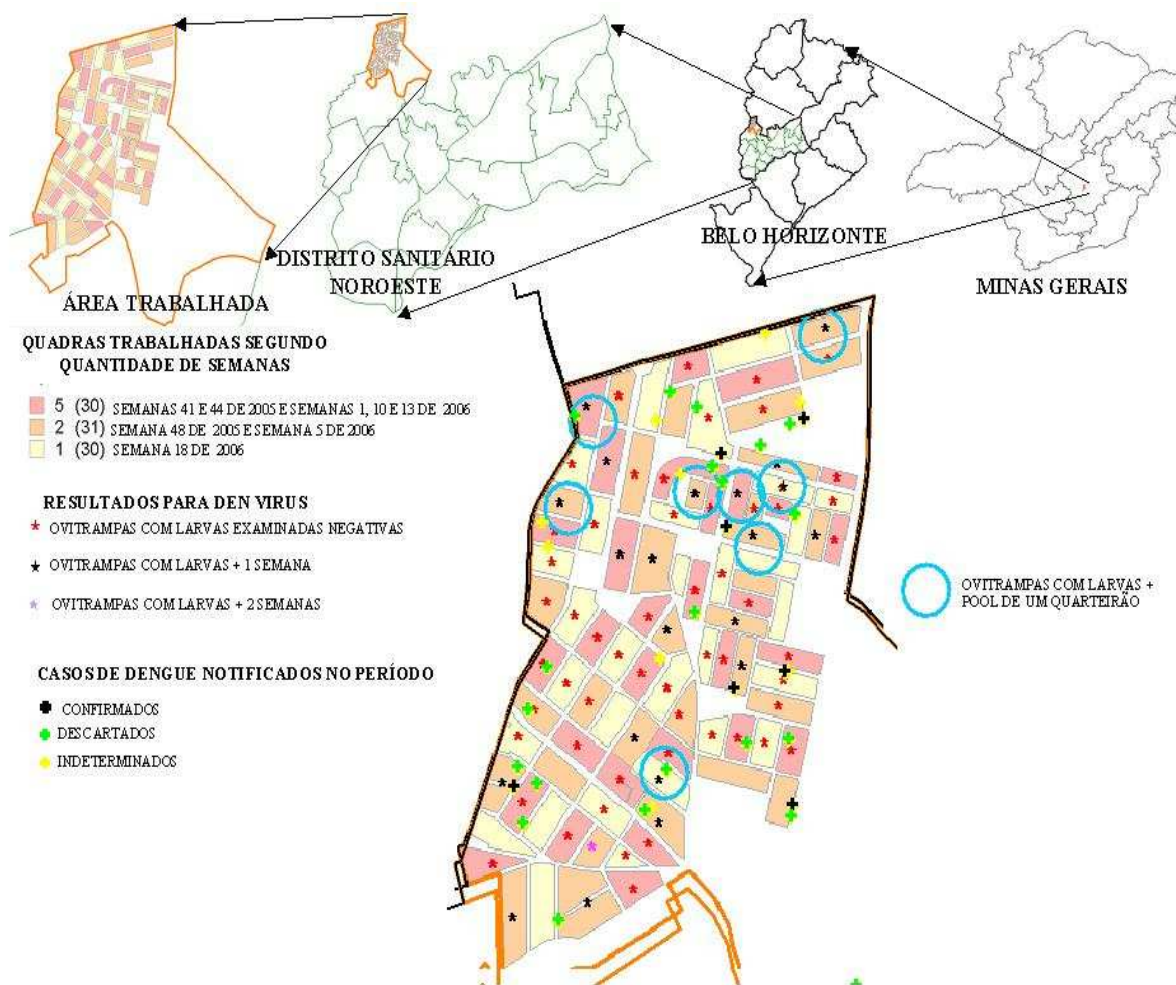


Figura 23 – Co-localização dos quarteirões do bairro Serrano em estudo de coleta de ovos de *Ae. aegypti*. O mapa co-localiza os quarteirões onde foram coletados os ovos, cujas larvas foram testadas por RT-semi nested PCR com os casos de FD notificados no período, confirmados ou não. * quarteirões com pools analisados que foram negativos para a amplificação de DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool; ★ quarteirões com pools positivos em apenas uma semana epidemiológica; ✱ quarteirões com pools positivos em duas semanas epidemiológicas, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool; ○ pools analisados que representavam quarteirões individualizados, e que foram positivos para DENV; ■ casos de FD confirmados; ● casos de FD descartados e ● casos de FD indeterminados.

Foi observado que os quarteirões de onde foram obtidos estes “pools” estão mais concentrados na região norte da área analisada. Em um quarteirão houve a concordância de uma amostra positiva com um caso de dengue confirmado, sendo que a detecção foi feita na semana epidemiológica 05 e o caso confirmado ocorreu em 30 de junho, que corresponde à semana epidemiológica 22. Embora não tenha ocorrido a sobreposição exata dos dados, as amostras positivas para a detecção do genoma viral se localizaram muito próximas aos casos indeterminados e confirmados de FD. Dois casos confirmados, um no dia 27 de março e o outro no dia 1º de abril, ambos correspondendo à semana epidemiológica 13, ficaram próximos a amostras positivas para detecção do genoma viral, também correspondentes à semana epidemiológica 05.

Na figura 24, são apresentados os dados obtidos pela coleta de mosquitos utilizando a MosquiTRAP. Os quadrados azuis representam os quarteirões que formaram “pools” analisados e que foram negativos para DENV. Os quadrados azuis com um X central representam os quarteirões que formaram “pools” analisados e que foram positivos para DENV.

A única amostra positiva para a detecção do genoma viral foi de um pool de fêmeas, representando dois quarteirões, que apresentou localização mais ao sul do bairro Serrano. Um caso confirmado de dengue está localizado exatamente em um dos quarteirões, podendo ser visualizada a sobreposição da positividade de detecção do genoma viral com um dos casos confirmados. A detecção do genoma viral foi feita na semana epidemiológica 10 e o caso confirmado ocorreu em 1º de abril, que corresponde à semana epidemiológica 13. O outro quarteirão, pertencente ao “pool” positivo para detecção do genoma viral, está muito próximo de três outros casos confirmados (27/03/2006; 18/04/2006 e 10/05/2006), correspondentes às semanas epidemiológicas 13, 16 e 19.

Na figura 25, são apresentados os dados obtidos pela coleta de mosquitos utilizando a BG-Trap®. Os “pools” analisados que foram negativos para DENV, com sua localização nos quarteirões, estão representados com o símbolo grego β em verde. Os pools analisados que foram positivos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada “pool”, estão representados com o símbolo grego β em vermelho.

As duas amostras positivas para a detecção do genoma viral estão representadas em letras gregas β vermelhas. Cada pool formado apresentou

seis quarteirões (pool de machos) e nove quarteirões (pool de fêmeas). Dois quarteirões pertencentes ao “pool” de fêmeas, e que foram positivos para a detecção do genoma viral, estavam localizados próximos a dois casos confirmados FD, correspondentes às semanas epidemiológicas 20 e 22. Um dos quarteirões positivos para a detecção do genoma viral, pertencente a um “pool” de machos, esteve muito próximo de outro caso confirmado, correspondente à semana epidemiológica 25. Os dados apresentaram positividade para a detecção de genoma de DENV em mosquitos machos e fêmeas, localizados próximos à ocorrência de casos de FD confirmados ocorridos após 10 semanas.

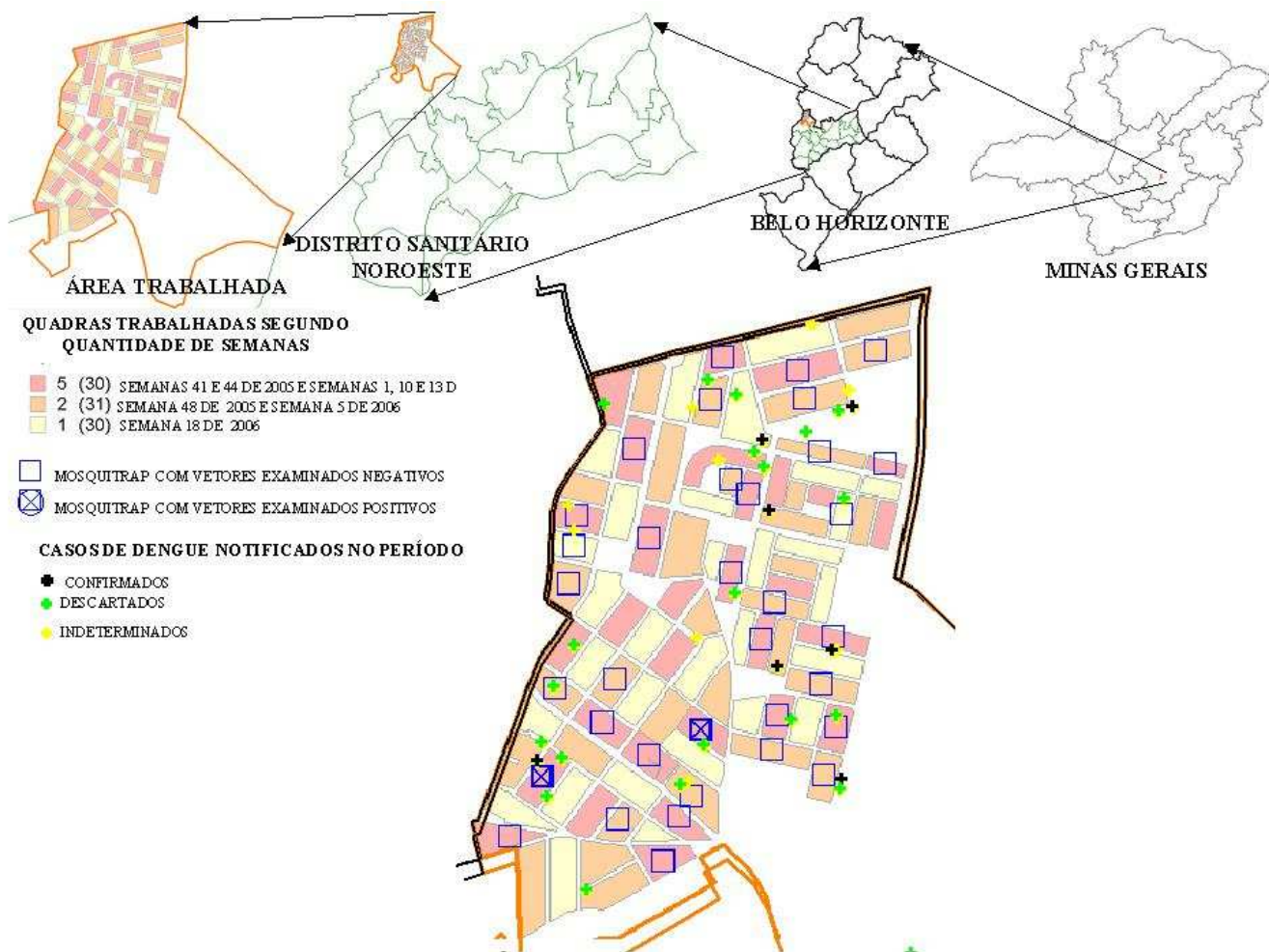


Figura 24 – Co-localização dos quarteirões do bairro Serrano em estudo de coleta de mosquitos de *Ae. aegypti*, para a MosquiTRAP. O mapa indica os quarteirões onde foram colocados os métodos de amostragem, onde foram coletados os mosquitos adultos testados por RT-semi nested PCR co-localizando os casos de FD notificados no período, confirmados ou não. □ quarteirões com pools analisados que foram negativos para DENV; ☒ quarteirões com pool analisado que foi positivo para DENV, com a localização dos quarteirões referentes ao pool; + casos de FD confirmados; + casos de FD descartados e + casos de FD indeterminados.

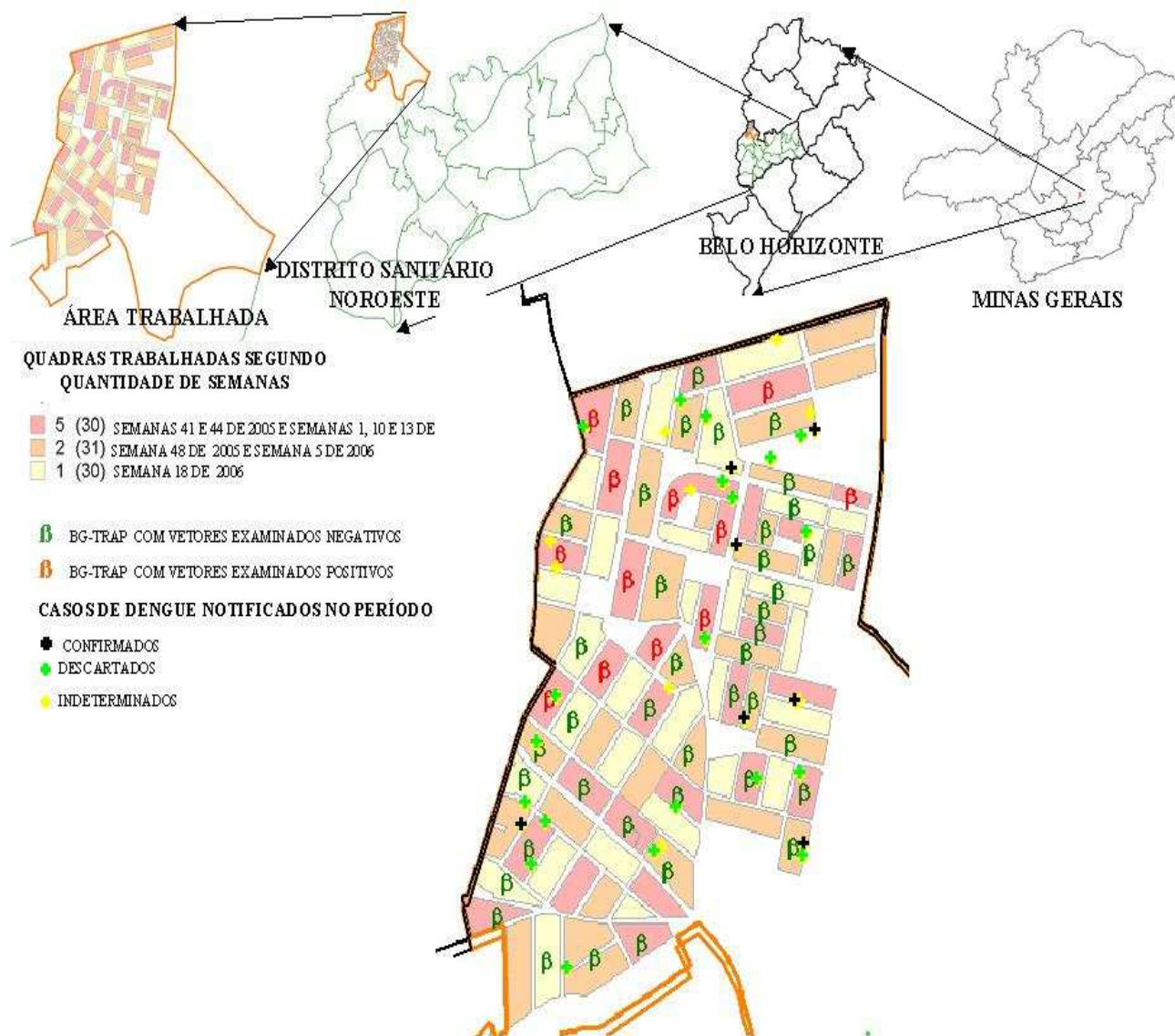


Figura 25 – Co-localização dos quarteirões do bairro Serrano em estudo de coleta de mosquitos de *Ae. aegypti*, para a BG-Trap®. O mapa indica os quarteirões onde foram colocados métodos de amostragem, os mosquitos coletados e testados por RT-semi nested PCR co-localizando os casos de FD notificados no período, confirmados ou não. β quarteirões com pools analisados que foram negativos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool; β quarteirões com pools analisados que foram positivos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool; + casos de FD confirmados; + casos de FD descartados e + casos de FD indeterminados.

Na figura 26, são apresentados os dados obtidos pela coleta de mosquitos utilizando o Aspirador de Nasci. Os oito “pools” analisados que foram negativos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes aos “pools”, estão representados com círculos verdes. O “pool” analisado que foi positivo para DENV, com a localização dos cinco quarteirões referentes ao “pool”, está representado com círculos verdes semi-preenchidos de verde mais escuro.

Nesta amostra, os quarteirões se encontraram distribuídos por toda a extensão da região de estudo. Em, pelo menos, três quarteirões foi possível observar a proximidade com casos confirmados de FD. O “pool” positivo para a detecção do genoma viral pertenceu à semana epidemiológica 18. Os casos confirmados, próximos aos três quarteirões desse “pool”, se estenderam da semana epidemiológica 13 a 25.

Na figura 27, são apresentados todos os dados de positividade sobrepostos, de todos os métodos de amostragem utilizados no período do estudo, a Ovitampa, a MosquiTRAP, a BG-Trap® e o Aspirador de Nasci. Com relação à positividade das amostras coletadas, tanto de larvas quanto de mosquitos adultos, para a detecção do genoma viral, foi possível observar a presença de DENV em quase todo o período de coleta. Os casos confirmados de FD aparecem a partir da 13ª semana epidemiológica (27/03/06), tendo um caso confirmado dia 23/06/06, um mês após o término das coletas.

A Ovitampa apresentou “pools” positivos para a detecção do genoma viral em cinco das oito semanas estudadas, enquanto que as amostras positivas para DENV em mosquitos adultos ficaram limitadas às semanas 10 e 18.



Figura 26 – Co-localização dos quarteirões do bairro Serrano em estudo de coleta de mosquitos de *Ae. aegypti*, para o Aspirador de Nasci. O mapa indica os quarteirões onde foram colocados os métodos de amostragem, onde foram coletados os mosquitos adultos testados por RT-semi nested PCR co-localizando os casos de FD notificados no período, confirmados ou não. 🟢 quarteirões com pool analisado que foi positivo para DENV, com a localização dos quarteirões referentes ao pool; 🟡 quarteirões com pools analisados que foram negativos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool; + casos de FD confirmados; + casos de FD descartados e + casos de FD indeterminados.

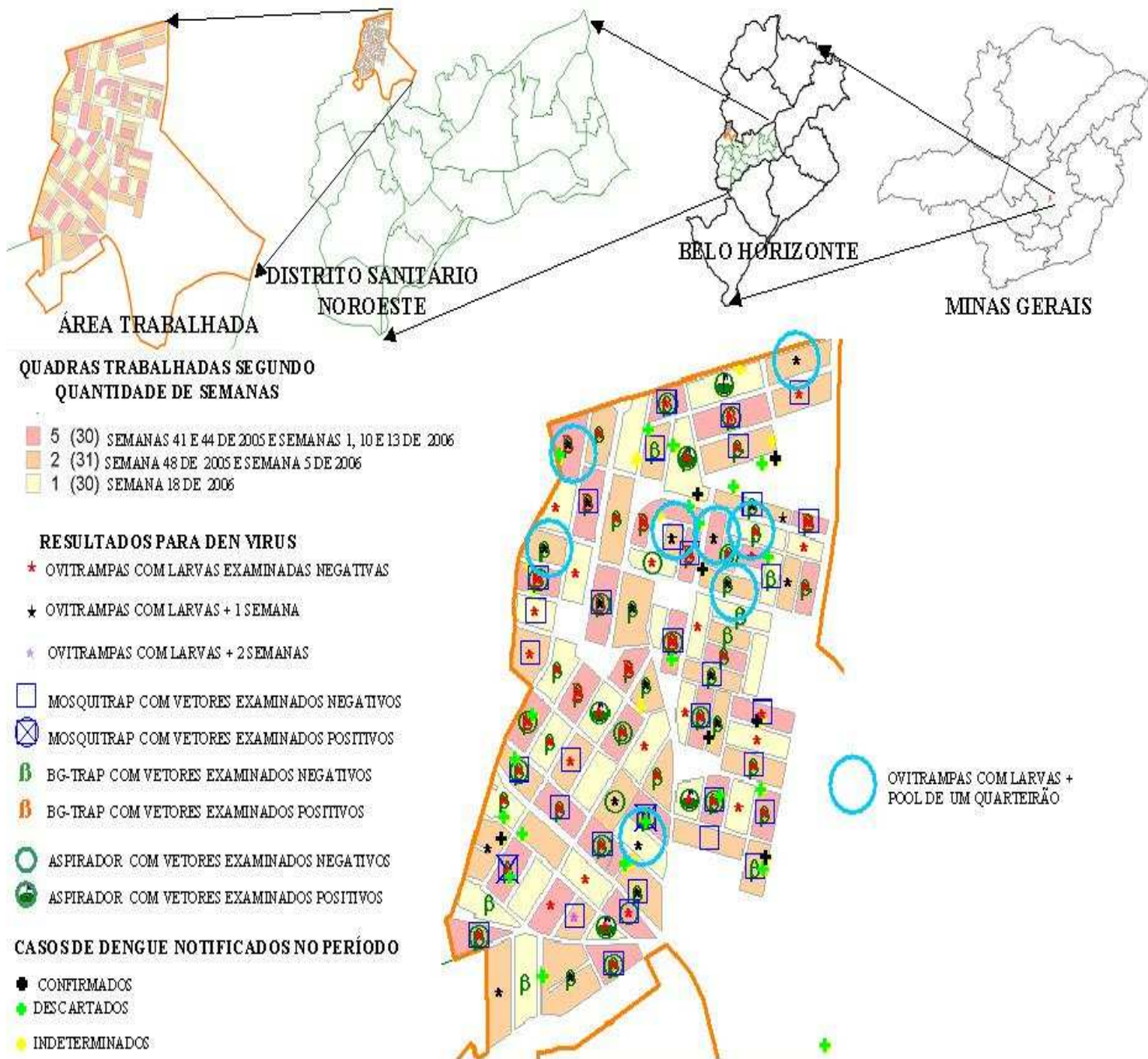











Figura 27 – Co-localização dos quarteirões do bairro Serrano em estudo de coleta de ovos e mosquitos de *Ae. aegypti*, para todos os métodos de amostragem. O mapa indica os quarteirões onde foram colocados os métodos de amostragem, onde foram coletados os mosquitos adultos e os ovos testados por RT-semi nested PCR co-localizando os casos de FD notificados no período, confirmados ou não. Ovitrapa - * quarteirões com pools analisados que foram negativos para a amplificação de DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool; ★ quarteirões com pools positivos em apenas uma semana epidemiológica; ☆ quarteirões

com pools positivos em duas semanas epidemiológicas, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool;  pools analisados que representavam quarteirões individualizados, e que foram positivos para DENV; MosquiTrap  quarteirões com pools analisados que foram negativos para DENV;  quarteirões com pool analisado que foi positivo para DENV, com a localização dos quarteirões referentes ao pool; BG-Trap -  quarteirões com pools analisados que foram negativos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool;  quarteirões com pools analisados que foram positivos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool; Aspirador de Nasci -  quarteirões com pools analisados que foram negativos para DENV, com a localização dos quarteirões referentes a cada pool;  quarteirões com pool analisado que foi positivo para DENV, com a localização dos quarteirões referentes ao pool; + casos de FD confirmados;  casos de FD descartados e  casos de FD indeterminados.

DISCUSSÃO

1 - COLETA DE MOSQUITOS E LARVAS DE *Ae. aegypti* EM DIFERENTES MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

Os métodos de amostragem se apresentaram como ferramentas úteis no monitoramento do vetor de DENV, o mosquito *Ae. aegypti*, oferecendo informações relevantes sobre a distribuição vetorial.

Algumas diferenças foram observadas quanto ao número de mosquitos e à quantidade de machos e fêmeas, coletados nos diferentes métodos de amostragem. O número de fêmeas coletadas pela MosquiTRAP é maior em relação aos machos, confirmando sua finalidade de capturar fêmeas, uma vez que o atraente sintético utilizado possui elementos específicos de oviposição para a espécie *Ae. aegypti* (Figura 11). Além disso, a MosquiTRAP apresenta também um ambiente escuro e com água limpa, propício à postura e eclosão dos ovos. Todos os mosquitos coletados pela MosquiTRAP foram da espécie *Ae. aegypti*, confirmando a capacidade seletiva do atraente sintético para esta espécie (Eiras & Sant'Ana, 2001). A coleta de mosquitos com a MosquiTRAP mostrou ser um método prático, que possibilita ao agente de campo o diagnóstico no momento da inspeção do método de amostragem, com rápida transferência dos dados ao MI-Dengue. Outra vantagem da MosquiTRAP é a eliminação do uso da infusão de gramineas, substituída pelo atraente sintético.

O número de machos coletados pela BG-Trap® mostrou-se maior que o número de fêmeas coletadas (Figura 11). Provavelmente, os machos procuram as fêmeas para cópula, próximo ao hospedeiro (homem).

O Aspirador de Nasci apresentou número de coleta igual para machos e fêmeas (Figura 11), provavelmente, por ser um método ativo, aleatório para captura de mosquitos, que depende, exclusivamente, do agente de campo que manuseia o aparelho, além de não apresentar qualquer tipo de atraente como cor, odor ou localização espacial.

Empregando-se a Ovitampa o sistema foi capaz de detectar ovos em todas as semanas de coleta, mostrando que o vetor esteve presente durante todo o período (Figura 12). A taxa geral de eclosão dos ovos (42,49%) foi semelhante aos dados observados por Evangelista (2003), que associa esse valor ao cuidado com o manuseio das palhetas de oviposição, ao serem

retiradas da Ovitampa, e ao acondicionamento dos ovos, até o momento da eclosão, prevenindo a ação de predadores e a desidratação do embrião. Todas as larvas que eclodiram dos ovos coletados pela Ovitampa foram identificadas como *Ae. aegypti*.

A MosquiTRAP se mostrou mais eficiente na coleta de fêmeas quando comparada à BG-Trap® e ao Aspirador de Naschi, confirmando a especificidade e eficiência na captura de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*. A BG-Trap® coletou o maior número de machos quando comparada aos outros dois métodos de amostragem. O número de fêmeas e machos, coletados pela BG-Trap®, foi muito próximo, mostrando a eficiência desta na captura tanto de machos quanto de fêmeas.

2 - DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR RT-PCR

a. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA

O protocolo de extração de RNA total, segundo Boom e colaboradores (1990), o original, mostrou-se mais eficiente na extração de RNA para posterior uso em RT-PCR quando comparado aos protocolos de extração utilizando o kit comercial (QIAGEN) e o protocolo modificado (Boom, 1990) (figura 13).

O tiocinato de guanidina vem sendo utilizado rotineiramente com sucesso no processo de extração (Urdaneta *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 1998; Wasieloski, *et al.*, 1994, Lanciotti *et al.*, 1992). Esse método, utilizando a sílica e o tiocianato, é um método simples que elimina etapas de proteólise com proteinase K e extrações com fenol clorofórmio. O RNA pode ser extraído de amostras clínicas (Figueiredo, 2006) e de mosquitos (Chung & Pang, 2002) e larvas (Evangelista, 2003; Chow *et al.*, 1998), além de servir para a obtenção de DNA complementar (Chungue *et al.*, 1993) como também foi observado neste trabalho.

b. TESTE DE SENSIBILIDADE DE DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL

O desenho de novos iniciadores para a amplificação da mesma região genômica descrita por Lanciotti e colaboradores (1992), com perda de 20 nucleotídeos iniciais, possibilitaram uma melhora significativa da sensibilidade do método descrito por Boom (1990).

Para a determinação da sensibilidade da detecção do genoma de DENV, foram feitos “pools” de 10 mosquitos, acrescidos com diluições de DENV-2, crescido em linhagem celular C6/36, com posterior extração de RNA e RT-PCR. Segundo Urdaneta *et al.* (2005), “pools” maiores de 20 unidades diminuem a sensibilidade de detecção do genoma viral.

O limite de detecção de RNA viral foi de 0,1 PFU, com cinco diluições, começando com 500 PFU (Figura 14). Urdaneta *et al.* (2005), também obteve uma sensibilidade de 0,1 PFU no limite de detecção para os quatro sorotipos de DENV, utilizando o RNAgens Total RNA Isolation System (Promega Corporation, USA).

A RT-PCR mostrou-se um método de detecção importante e está sendo cada vez mais utilizada para a detecção precoce e tipagem do genoma viral (De Oliveira Poersch *et al.*, 2005). As reações de PCR padronizadas, utilizando iniciadores descritos por Lanciotti *et al.* (1992) e o novo iniciador senso desenhado, utilizado em reação de “Semi-Nested”-PCR, mostraram-se eficientes para detecção do vírus.

3 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS DOS MOSQUITOS E LARVAS

O total de “pools” de mosquitos analisados foi de 31, e o total de pools de larvas analisados foi de 114. Dos 31 pools de mosquitos analisados, quatro (12,9%) foram positivos para a detecção do genoma viral. Trabalhos semelhantes feitos por Pinheiro *et al.* (2005), obtiveram 17,1% de “pools” de *Ae. aegypti* positivos para a detecção do genoma de DENV-3 e Urdaneta *et al.* (2005) encontrou 17,9% de pools de *Ae. aegypti* positivos para a detecção do genoma de DENV.

Os quatro métodos de amostragem se mostraram eficientes na captura dos vetores de DENV. Dos três métodos de amostragem utilizados na captura

da forma alada do vetor, em relação à detecção do genoma viral, a MosquiTRAP (16,6%) apresentou positividade maior quando comparada à BG-Trap®, mostrando que o número de fêmeas contaminadas é maior que no restante da população analisada. O número de pools analisados entre as armadilhas foi diferente, sendo que, a MosquiTRAP apresentou o menor número, justificando a maior porcentagem de detecção de DENV nos pools de mosquitos.

O Aspirador de Nasci e a BG-Trap® apresentaram positividade para a detecção de genoma viral em “pools” de machos de *Ae. aegypti*, de 20% e 14,3%, respectivamente. Kow *et al.* (2001) encontrou 1,3% de positividade na detecção do genoma de DENV em machos de *Ae. aegypti*. O dado obtido nesse estudo reforça a transmissão vertical de DENV em populações de *Ae. aegypti* e a possível transmissão de DENV às fêmeas durante a cópula por machos infectados transovarialmente. A detecção do genoma viral nos métodos de amostragem para mosquitos adultos reforça a importância do uso de novos métodos de controle do vetor, tanto no controle de população, quanto na vigilância da circulação de DENV nessas populações, a fim de prevenir epidemias de FD, adotando as medidas necessárias.

A Ovitampa também apresentou positividade na detecção do genoma viral nos “pools” de larvas de *Ae. aegypti* analisados (13,2%). Esses dados corroboram com os dados encontrados por Evangelista (2003), que encontrou 17,46% de positividade para a detecção do genoma viral nos “pools” de larvas analisados, embora, o percentual apresentado para a regional tenha sido de apenas 4,8%, em se tratando da regional que apresenta os maiores registros de FD no município de Belo Horizonte (Secretaria Estadual de Saúde e Secretaria Municipal de Saúde).

Com os dados obtidos pela Ovitampa, fica mais uma vez confirmada a transmissão vertical de DENV na população de *Ae. aegypti*, observada por Evangelista (2003) e por Freier & Rosen (1988). A transmissão vertical é uma das formas de manutenção da circulação do DENV na natureza, ou seja, na população de *Ae. aegypti*, nos períodos interepidêmicos, o que reforça a necessidade de estudos que busquem medidas de controle e prevenção tanto da população de *Ae. aegypti* quanto do agente causador da FD, o DENV.

Outro fator observado neste estudo foi a distribuição temporal da população de *Ae. aegypti* analisada. O período do estudo corresponde ao início

da estação quente e úmida, o verão, que favorece o desenvolvimento populacional do vetor (Glasser & Gomes, 2002). O clima de Belo Horizonte é tropical de altitude e a cidade não apresenta grandes diferenças nas quatro estações do ano, sendo dividido apenas em verão ou inverno. Os verões apresentam temperaturas mínimas médias de 18°C e máximas médias de 28°C (http://pt.wikipedia.org/wiki/Belo_Horizonte#Clima-). Segundo Beserra *et al.* (2006), a faixa de temperatura encontrada para o desenvolvimento favorável de *Ae. aegypti* encontra-se entre 21°C a 29°C, e para a longevidade e fecundidade dos adultos entre 22°C e 30°C. Neste trabalho, foi observada a captura de *Ae. aegypti* em todas as semanas epidemiológicas coletadas e analisadas. Isso condiz com o comportamento sazonal já descrito para a espécie *Ae. aegypti* (Barata *et al.*, 2007).

4 - PURIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO DE JUNÇÃO DOS GENES C-prM

No presente trabalho, foram seqüenciadas quatro amostras de “pools” de larvas e mosquitos adultos, positivas para a detecção do genoma de DENV, coletadas no período de outubro de 2005 a maio de 2006, em Belo Horizonte, MG. Todas as amostras dos espécimes de *Ae. aegypti* foram classificadas como sorotipo DENV-3 e apresentaram alta similaridade com as amostras das Filipinas (M93130), da China (AF317645) e de Minas Gerais (Figueiredo, 2006).

De acordo com o resultado filogenético, construído a partir da região genômica C-prM (Figura 20), as amostras dos espécimes de *Ae. aegypti* foram agrupadas junto com as amostras identificadas como pertencentes ao grupo do genótipo I de DENV-3 (Lanciotti *et al.*, 1994), do total das amostras utilizadas na construção da árvore. A mesma similaridade foi observada por Figueiredo (2006) quando fez o isolamento viral de nove amostras de soros de pacientes apresentando quadro de FD e FHD, nos anos de 2002 e 2004, no Estado de Minas Gerais, incluindo o município de Belo Horizonte.

No Brasil, amostras do Rio de Janeiro segundo De Simone *et al.* (2004) e Lourenço-de-Oliveira *et al.* (2002) foram caracterizadas como pertencentes ao sorotipo DENV-3. Urdaneta *et al.* (2005) também detectou DENV-3 em Maracay, na Venezuela. Pinheiro *et al.* (2005) encontrou amostras de mosquitos

capturados em Manaus, AM, infectadas com DENV-3, genótipo III, usando os iniciadores de Lanciotti *et al.* (1992).

Até o momento, o único relato da circulação do genótipo I de DENV-3, no Brasil, é o de Figueiredo (2006), no Estado de Minas Gerais, de isolados de soro de pacientes. O presente trabalho reforça a circulação do genótipo I, cujas amostras analisadas apresentaram similaridade alta, tanto com as amostras asiáticas, como com as amostras isoladas por Figueiredo (2006).

Dois anos após o primeiro relato do genótipo I de DENV-3 (Figueiredo, 2006), os dados apresentados neste trabalho mostram a circulação do genótipo introduzido, no Brasil, em população de *Ae. aegypti*, coletada na região de maior incidência de casos de FD, do município de Belo Horizonte, MG (Secretaria da Saúde de Belo Horizonte).

A circulação dos quatro sorotipos de DENV na zona equatorial mundial, a ampla dispersão do vetor *Ae. aegypti* no mundo e a alta densidade populacional são fatores que proporcionam a rápida dispersão da FD, e da sua forma mais grave, a FHD. O grande fluxo de pessoas que transitam para qualquer parte do mundo em viagens aéreas, assim como o crescimento urbano desenfreado e o acúmulo irregular de lixo doméstico favorecem o desenvolvimento do vetor, intensificando essa dispersão (revisado por Halstead, 2007). Esses fatores sugerem a possibilidade do genótipo I de DENV-3, também detectado nas amostras de mosquitos adultos e ovos coletados do campo, ser um vírus importado de outro continente, com probabilidade de rápida dispersão pelo país.

5 - MAPAS DE CO-LOCALIZAÇÃO

Nos mapas de co-localização estão apresentados os dados da positividade dos métodos de amostragem para captura da espécie *Ae. aegypti*, das amostras positivas para a detecção do genoma de DENV e os casos de FD descartados, indeterminados e confirmados, no período de outubro de 2005 a maio de 2006.

Cada método de amostragem utilizado, durante o período do estudo, apresentou uma dispersão dentro do bairro Serrano, para a positividade dos dados analisados. Quando se observa o mapa de sobreposição dos dados de todos os métodos de amostragem (Figura 27), fica clara a distribuição da

população do vetor *Ae. aegypti* em toda a área estudada, assim como a distribuição do agente infeccioso DENV na população do mosquito vetor analisada.

Embora as amostras analisadas para a detecção do genoma viral não terem sido referentes a um único quarteirão, foi possível a delimitação de uma microrregião onde é possível encontrar DENV circulante e presença do vetor. Esses dados são importantes para se tomar medidas prévias contra possíveis epidemias de FD, facilitando a delimitação da área a ser trabalhada.

De acordo com dados fornecidos pela Secretaria de Saúde de Belo Horizonte (Mapa 6), no período do estudo, as datas de confirmação dos casos de FD, referentes às semanas epidemiológicas 13, 16, 19, 20, 22 e 25, foram próximas às semanas positivas para a presença de DENV, tanto em larvas (semanas epidemiológicas 44, 48, 01, 05 e 18) como em mosquitos adultos (semanas epidemiológicas 10 e 18). Um dado interessante foi a não detecção do genoma viral na semana epidemiológica 13, que apresentou dois casos de FD confirmados. Possivelmente, o número de amostras de larvas e mosquitos adultos analisado não tenha sido suficiente para detectar a presença de DENV na população de *Ae. aegypti*.

A maioria dos “pools” de larvas de *Ae. aegypti* positivos para DENV, se encontraram nas semanas anteriores ao registro dos casos confirmados de FD. Todos os “pools” de mosquitos adultos foram encontrados nas semanas epidemiológicas 10 e 18, adjacentes às semanas com o maior número de casos confirmados da doença. Urdaneta *et al.* (2005), encontraram DENV em mosquitos adultos coletados em Maracay, em 2001, oito semanas antes do aumento epidêmico de casos de FD. No presente estudo, foi observada a detecção do genoma viral até 17 semanas antes do aumento do número de casos de FD. Provavelmente, o maior número de “pools” positivos para DENV nas larvas, referente aos meses anteriores ao aparecimento dos casos confirmados de FD, foi devido ao maior número de “pools” de larvas analisados quando comparado ao número de pools de mosquitos adultos.

A vigilância de pequenos surtos de FD e o acompanhamento da dinâmica de população de *Ae. aegypti* são de extrema importância na epidemiologia da doença.

CONCLUSÕES

- 1.As técnicas moleculares utilizadas para a detecção do genoma de DENV foram sensíveis, sendo um método rápido de detecção do DENV circulante. O iniciador senso desenhado neste trabalho (D1.1), utilizado juntamente com o iniciador anti-senso (D2) de Lanciotti *et al.*, 1992, na reação de “Semi-Nested”-PCR, aumentou a sensibilidade da detecção do genoma viral.
- 2.Os métodos de amostragem das populações de *Aedes aegypti*, para formas imaturas e maduras, se mostraram eficientes para detectar o vetor da arbovirose considerada mais prevalente e crescente, atualmente, no mundo.
- 3.Os dados apresentados neste trabalho mostraram que o DENV está circulante na população de *Ae. aegypti* e que estudos de predição de epidemias de FD poderão ser possíveis.
- 4.Os mapas de co-localização se mostraram importantes, uma vez que mostram a possível localização da presença do vetor, assim como do vírus circulante, num estudo de prevenção e controle, gerando dados seguros que permitem aos agentes de campo tomarem medidas rápidas e eficazes no controle da FD.
- 5.A confirmação do genotipo I de DENV-3, por sequenciamento molecular, é um alerta para a circulação de um novo genotipo no território brasileiro, onde só havia sido detectado o genotipo III de DENV-3. Esse dado é de extrema importância para a Saúde Pública brasileira, uma vez que um novo vírus circulante, numa população susceptível a ele, pode provocar graves epidemias de FD, e sua forma mais grave, a FHD/SCD.
- 6.O monitoramento da circulação do DENV e a tipagem dos sorotipos e genotipos na população do mosquito *Ae. aegypti* seriam determinantes em medidas a serem tomadas, no caso de possíveis epidemias.
- 7.A concordância dos dados de positividade para a detecção de DENV obtidos com os casos de FD confirmados, espacial e temporalmente, aponta um método novo e sensível no estudo epidemiológico de FD, que poderá servir de alicerce aos órgãos governamentais em medidas de controle e prevenção de epidemias.

BIBLIOGRAFIA

Aleshin, A. E., S. A. Shiryayev, *et al.* Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the *Flaviviridae* fold. *Protein Sci*, v.16, n.5, May, p.795-806. 2007.

Alvarez, D. E., M. F. Lodeiro, *et al.* Long-range RNA-RNA interactions circularize the *Dengue virus* genome. *J Virol*, v.79, n.11, Jun, p.6631-43. 2005.

Bancroft, T. L. On the aetiology of dengue fever. *Aust. Med. Gaz.*, v.25, p.17-18. 1906.

Barata, E. A., F. Chiaravalloti Neto, *et al.* [Capture of culicids in urban areas: evaluation of the resting box method]. *Rev Saude Publica*, v.41, n.3, Jun, p.375-82. 2007.

Barata, E. Am. F., Costa, A. I. P., Neto, F. C., Glasser, C. M., Barata, J. M. S. & D. Natal. *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in Southeast Brazil. *Revista de Saúde Pública*, vol.35(3), p.237-42. 2001.

Barth, O. M. Replication of *Dengue viruses* in mosquito cell cultures--a model from ultrastructural observations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.87, n.4, Oct-Dec, p.565-74. 1992.

Barth, O. M., L. M. Cortes, *et al.* Ultrastructural aspects of the replication of *Dengue virus* type 2 isolated in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.91, n.2, Mar-Apr, p.255-6. 1996.

Batista, W. C., S. Kashima, *et al.* Phylogenetic analysis of Brazilian *Flavivirus* using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3' non-coding regions. *Virus Res*, v.75, n.1, May, p.35-42. 2001.

Beserra, E. B., F. P. De Castro, Jr., *et al.* [Biology and thermal exigency of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: *Culicidae*) from four bioclimatic localities of Paraiba]. *Neotrop Entomol*, v.35, n.6, Nov-Dec, p.853-60. 2006.

Boom, R., C. J. Sol, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, v.28, n.3, Mar, p.495-503. 1990.

Braga, E. L., P. Moura, *et al.* Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, n.2, Feb, p.229-32. 2001.

Braga, I. A.; Gomes, A. C.; Nelson, M.; Mello, R. C.; Bergamaschi, D. P.; & J. M. Souza. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. *Soc. Bras. Med. Trop.* 33:347-353. 2000.

Brandt, W. E., J. M. Mccown, *et al.* Infection enhancement of dengue type 2 virus in the U-937 human monocyte cell line by antibodies to *Flavivirus* cross-reactive determinants. *Infect Immun*, v.36, n.3, Jun, p.1036-41. 1982.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual do dengue: vigilância epidemiológica e atenção ao doente. Brasília, DF, 82 p. 1996.

Camara, F. P., R. L. Theophilo, *et al.* [Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.40, n.2, Mar-Apr, p.192-6. 2007.

Chan, S. Y., Kautner, I. M., Lam, S. K.. The influence of antibody levels in dengue diagnosis by polimerase chain reaction. *Journal of Virology Methods*, vol. 49(3), p. 315-322. 1994.

Chaturvedi, U. C., R. Shrivastava, *et al.* Dengue vaccines: problems and prospects. *Indian J Med Res*, v.121, n.5, May, p.639-52. 2005.

Chaturvedi, U., R. Nagar, *et al.* Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.47, n.2, Jul, p.155-66. 2006.

Chen, H., F. M. Hofman, *et al.* Both Virus and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Critical for Endothelium Damage in a Mouse Model of Dengue Virus-Induced Hemorrhage. *J Vir*, v.81, n.11, Jun, p. 5518–5526. 2007.

Chow, V. T., Y. C. Chan, *et al.* 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 Trop Med Hyg*, v.58, n.5, May, p.578-86. 1998.

Chung, Y. K. e F. Y. Pang. *Dengue virus* infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. *Trop Med Int Health*, v.7, n.4, Apr, p.322-30. 2002.

Chungue, E., C. Roche, *et al.* Ultra-rapid, simple, sensitive, and economical silica method for extraction of dengue viral RNA from clinical specimens and mosquitoes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Med Virol*, v.40, n.2, Jun, p.142-5. 1993.

Clark, G. G.; Seda, H. & D. J. Gubler. Use of the "CDC backpack aspirator" for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. *J Am Mosq Control Assoc* 10: 119-124. 1994.

Cologna, R., P. M. Armstrong, *et al.* Selection for virulent *Dengue viruses* occurs in humans and mosquitoes. *J Virol*, v.79, n.2, Jan, p.853-9. 2005.

Consoli, R. A. G. B. & R. L. Oliveira. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, 228p, Rio de Janeiro. 1994.

Correa, P. R., E. Franca, *et al.* [*Aedes aegypti* infestation and occurrence of dengue in the city of Belo Horizonte, Brazil]. *Rev Saude Publica*, v.39, n.1, Feb, p.33-40. 2005.

De Oliveira Poersch, C., D. P. Pavoni, *et al.* Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. J Clin Virol, v.32, n.4, Apr, p.272-7. 2005.

De Paula, S. O., Nunes, C., Matos, R., Oliveira, Z. M., Lima, D. M. & B. A. L. Fonseca. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, vol.98, p.119-125. 2001.

De Simone, T. S., *et al.* Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Roy Soc Trop Med Hyg, v.98, Sep, p.553-562. 2004.

Donalisio, M. R. O dengue no espaço habitado. São Paulo: HICITEC: Funcraf. 1999.

Eiras, A. E. *Culicidae*. In Neves, D.P, Melo, A.L., Genaro, O. & Linardi, P.M. Parasitologia Humana, 9ª ed., Atheneu, Belo Horizonte. 2000.

Eiras, A. E.; Silva, I. M.; M. C. Resende. Proposta de novo método de monitoramento e de novos índices de vigilância entomológica usando MosquiTRAP, uma nova armadilha para captura de adultos do mosquito *Aedes aegypti*. (Relatório Técnico enviado à Funasa. Artigo em fase final de elaboração). 2003.

Eiras, A. E. & M. Geier. Composition for attracting blood sucking arthropods. USA Patente No. 60/386,582, Data: 06/07/2002. 2002.

Eiras, A. E. Armadilha para captura de mosquitos. 2002. Patente: Privilégio e Inovação. n. PI0203907-9, "Armadilha para captura de mosquitos". 05 de set. 2002.

Eiras, A. E.; Sant'ana, A. L. & K. Stein. Identification of volatiles from grass infusions that attract gravid *Aedes aegypti* mosquito In: 3rd International Congress of Vector Ecology, Barcelona, Espanha, Abstract book. p.64. 2001.

Eiras, A. E. & A. L. Sant'Ana. Atraentes de Oviposição de Mosquitos. 2001. Patente: Privilégio e Inovação. n. PI0106701-0, "Atraentes de Oviposição de Mosquitos". 20 de dez. 2001.

Evangelista, K. S. Estudo da transmissão vertical de *Dengue virus* em mosquitos do gênero *Aedes* no município de Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais. 2003.

Figueiredo, L. T., W. C. Batista, *et al.* Detection and identification of *Dengue virus* isolates from Brazil by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.39, n.2, Mar-Apr, p.79-83. 1997.

Figueiredo, L. T. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. *Virus Rev. & Res.*, v.01, p.09-16. 1996.

Figueiredo, L. B. Isolamento, identificação e caracterização de amostras isoladas de *Dengue virus* 3 circulantes em Minas gerais no período de 2002 a 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.

Focks, D. A. A review of Entomological Sampling Methods and Indicators for dengue vectors. WHO/TRD. 2003.

Franco, O. [The eradication of *Aedes aegypti* in Brazil.]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, v.13, Jan-Jun, p.43-8. 1961.

Franco, O. História da Febre Amarela no Brasil. Ministério da Saúde, Brasil, p.208. 1976.

Freier, J. E. e L. Rosen. Vertical transmission of *Dengue viruses* by *Aedes mediovittatus*. Am J Trop Med Hyg, v.39, n.2, Aug, p.218-22. 1988.

Fundação Nacional de Saúde. Dengue – Instrução para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas . – 3ª ed. , rev. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação nacional da Saúde. 84p. Disponível em <[http:// www. funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br)>. 2001.

Geier, M. & A. E. Eiras. A new device to catch sucking arthropods. USA Patente No. 61/387,4791, Data: 15/03/2003. 2003.

Glasser, C. M. e C. Gomes Ad Ade. [Climate and the superimposed distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* on infestation of Sao Paulo State, Brazil]. Rev Saude Publica, v.36, n.2, Apr, p.166-72. 2002.

Gomes, A. C. Medidas dos Níveis de Infestação Urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância epidemiológica. IESUS, VII(3), jul/set. 1998.

Gubler, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev, v.11, n.3, Jul, p.480-96. 1998.

Gubler, D. J. e D. W. Trent. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. Infect Agents Dis, v.2, n.6, Dec, p.383-93. 1993.

Gubler, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends Microbiol, v.10, n.2, Feb, p.100-3. 2002.

Gubler, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. Arch Med Res, v.33, n.4, Jul-Aug, p.330-42. 2002.

Gubler, D. J., Kuno, J. E., Sather, G. E., Véles & A. Oliver. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies for routine surveillance of *Dengue viruses*. Vol. 33, Am.J.Trop. Med. Hyg. p.158-185. 1988.

Guzman, M. G. e G. Kouri. ADENVances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab Immunol, v.3, n.6, Nov, p.621-7. 1996.

Guzman, M. G. e G. Kouri. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. J Clin Virol, v.27, n.1, May, p.1-13. 2003.

Guzman, M. G. e G. Kouri. Dengue: an update. Lancet Infect Dis, v.2, n.1, Jan, p.33-42. 2002.

Halstead, S. B. *Dengue virus*-Mosquito Interactions. Annu Rev Entomol, Sep 5. 2007.

Halstead, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. Yale J Biol Med, v.42, n.5, Apr, p.350-62. 1970.

Halstead, S. B., J. S. Porterfield, *et al.* Enhancement of *Dengue virus* infection in monocytes by *Flavivirus* antisera. Am J Trop Med Hyg, v.29, n.4, Jul, p.638-42. 1980.

Harris, E., T. G. Roberts, *et al.* Typing of *Dengue viruses* in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol, v.36, n.9, Sep, p.2634-9. 1998.

Holmes, E. C. e S. S. Burch. The causes and consequences of genetic variation in *Dengue virus*. Trends Microbiol, v.8, n.2, Feb, p.74-7. 2000.

Holmes, E. C. e S. S. Twiddy. The origin, emergence and evolutionary genetics of *Dengue virus*. Infect Genet Evol, v.3, n.1, May, p.19-28. 2003.

Huang, K. J., S. Y. Li, *et al.* Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol*, v.81, n.Pt 9, Sep, p.2177-82. 2000.

ICTV. Comitê Internacional de nomenclatura de vírus. 2006.

Ilkal, M. A., V. Dhanda, *et al.* Entomological investigations during outbreaks of dengue fever in certain villages in Maharashtra state. *Indian J Med Res*, v.93, May, p.174-8. 1991.

Kalayanarooj, S., D. W. Vaughn, *et al.* Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*, v.176, n.2, Aug, p.313-21. 1997.

Kow, C. Y., L. L. Koon, *et al.* 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, Jul, p.475-9. 2001.

Lam, K. S. K. & I. D. Marchall. Dual infections of *Aedes aegypti* with arboviruses. *Am.J.Trop. Med. Hyg.*vol.1(4),p.635-636. 1968.

Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, *et al.* Rapid detection and typing of *Dengue viruses* from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, v.30, n.3, Mar, p.545-51. 1992.

Lanciotti, R. S., D. J. Gubler, *et al.* Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*, v.78 (Pt 9), Sep, p.2279-84. 1997.

Lanciotti, R. S., J. G. Lewis, *et al.* Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*, v.75 (Pt 1), Jan, p.65-75. 1994.

Leitmeyer, K. C., D. W. Vaughn, *et al.* *Dengue virus* structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*, v.73, n.6, Jun, p.4738-47. 1999.

Leyssen, P., E. De Clercq, *et al.* Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin Microbiol Rev*, v.13, n.1, Jan, p.67-82, table of contents. 2000.

Lindebach, B. D. & B. M. Rice. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. Fields Virology 4 ed, Lippincott Williams & Wilhins, Philadelphia, p.991-1041. 2001.

Lourenço-de-Oliveira, R., Nildimar, A. H., *et al.* Dengue Virus Type 3 Isolation from *Aedes aegypti* in the Municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. Mem Inst Osw Cruz, RJ, v.97, n.6, Sep, p.799-800. 2002.

Lozach, P. Y., L. Burleigh, *et al.* Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. J Biol Chem, v. 280, n. 25, Jun, p. 23698–23708. 2005.

Mackenzie, J. S., D. J. Gubler, *et al.* Emerging *Flaviviruses*: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and *Dengue viruses*. Nat Med, v.10, n.12 Suppl, Dec, p.S98-109. 2004.

Mariano, F. Dengue: Considerações relacionadas a sua presença no Rio Grande do Sul, em 1916. Arquivos Brasileiros de Medicina, v.7, p.263-266, 1917.

Mcbride, W. J. H. & H. Bielefeldt-Ohmann. Dengue viral infection; pathogenesis and epidemiology. Microbes and Infection Review, p.1041-1050. 2000.

Melino, S. e M. Paci. Progress for *Dengue virus* diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. Febs J, v.274, n.12, Jun, p.2986-3002. 2007.

Ministério da Saúde, National Epidemiology Center, National Health Foundation. 2000.

Monath, T. P. Stability of yellow fever vaccine. Dev Biol Stand, v.87, p.219-25. 1996.

Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn, *et al.* A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. *Nat Rev Microbiol*, v.3, n.1, Jan, p.13-22. 2005.

Nogueira, R. M., H. G. Schatzmayr, *et al.* *Dengue virus* type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*, v.11, n.9, Sep, p.1376-81. 2005.

Organização Mundial da Saúde (2001). *Dengue hemorrágica – Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle*. 2ª ed. São Paulo. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda. 2001.

Osanaí, C. H., A. P. Travassos Da Rosa, *et al.* [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.25, n.1, Jan-Feb, p.53-4. 1983.

Pan American Health Organization. *Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines of Prevention and control*. PAHO Sci Publ, n.548. 1994.

Pinheiro, F. P. e S. J. Corber. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*, v.50, n.3-4, p.161-9. 1997.

Pinheiro, V. C., W. P. Tadei, *et al.* Detection of *Dengue virus* serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, *Culicidae*) captured in Manaus, Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.100, n.8, Dec, p.833-9. 2005.

Rice, C. M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. *Fields virology*, 3ed. Raven, Philadelphia. 1996.

Rigau-Perez, J. G., G. G. Clark, *et al.* Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, v.352, n.9132, Sep 19, p.971-7. 1998.

Rosen, L.. Sexual Transmission of *Dengue viruses* by *Aedes albopictus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* vol.37 (2) p.398-402 . 1987.

Russel, P. K., Brandt, W. E., J. M. Dalrymple. Chemical and antigenic structure of *Flaviviruses*. In: Schlesinger, R. W. (Ed). *The Togaviruses: biologystructure, replication*. New York, Academic, p. 503-529. 1980.

Sabin, A. B. e R. W. Schlesinger. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science*, v.101, n.2634, Jun 22, p.640-642. 1945.

Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

Schatzmayr, H. G. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.95 Suppl 1, p.179-81. 2000.

Schatzmayr, H. G., R. M. Nogueira, *et al.* An outbreak of *Dengue virus* at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.81, n.2, Apr-Jun, p.245-6. 1986.

Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, dados não publicados, 2001.

Service, M. W. *Mosquito Ecology-Field Sampling Methods*. Second edition. London: Chapman & Hal, p. 988.1993.

Siler, J. F., Hall, M. W., A. P. Kitchens. *Dengue: its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention*. *Philippine J. Sci.*, v.29, p.1-304. 1926.

Simmons, J. S., St. John, J. H., F. H. K. *Experimental studies of dengue*. *Philippine Sc.*, v.44, p.1-251. 1931.

Siqueira, J. B., Jr., C. M. Martelli, *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*, v.11, n.1, Jan, p.48-53. 2005.

Solomon, T. e M. Mallewa. Dengue and other emerging *Flaviviruses*. *J Infect*, v.42, n.2, Feb, p.104-15. 2001.

Stein, D. A. e P. Y. Shi. Nucleic acid-based inhibition of *Flavivirus* infections. *Front Biosci*, v.13, p.1385-95. 2008.

Teixeira, M. G.; Barreto, M. L. & Z. Guerra. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*, v. 8, n. 4, p. 5-33. 1999.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, v.22, n.22, Nov 11, p.4673-80. 1994.

Urdaneta, L., F. Herrera, *et al.* 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, Mar, p.177-84. 2005.

Wang, W. K., C. N. Lee, *et al.* Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of *Dengue virus* RNA. *J Clin Microbiol*, v.38, n.9, Sep, p.3306-10. 2000.

Wasieloski, L. P., Jr., A. Rayms-Keller, *et al.* Reverse transcription-PCR detection of LaCrosse virus in mosquitoes and comparison with enzyme immunoassay and virus isolation. *J Clin Microbiol*, v.32, n.9, Sep, p.2076-80. 1994.

Watts, D. M., D. S. Burke, *et al.* Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg*, v.36, n.1, Jan, p.143-52. 1987.

Watts, D.M, Porter, K.R., Putvatana, P., Vasquez, B., Calampa, C., Hayes, C.G. & S. B. Halstead. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*, vol.354, p.1431-1434. 1999.

Weaver, S. C. e A. D. Barrett. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*, v.2, n.10, Oct, p.789-801. 2004.

Westaway, E. G. *Flaviviridae*. *Intervirology*, v.24, p.183-9. 1985.

Zhou, Y., D. Ray, *et al.* Structure and function of *Flavivirus* NS5 methyltransferase. *J Virol*, v.81, n.8, Apr, p.3891-903. 2007.