

Jerônimo Sérgio Avendanha

**MONITORAMENTO VETORIAL E DO VÍRUS DENGUE,
BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2006

A951m Avendanha, Jerônimo Sérgio, 1964-
Monitoramento vetorial e do vírus dengue em Belo Horizonte,
Minas Gerais / Jerônimo Sérgio Avendanha. –2006.
42 p. :il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Dengue – Controle – Teses. 2. *Aedes aegypti* – Controle -
Teses. 3. Relação vírus-vetor – Teses. 4. Epidemiologia – Teses.
I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 616.92

Assinaturas

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos muitos pampulhanos anônimos que colaboraram com o monitoramento do Aedes aegypti, cedendo gentilmente os seus domicílios.

AGRADECIMENTOS

A Maria da Conceição, “mulher da minha vida”.

A Fernanda e Renata, “meninas dos meus olhos”.

A Maria Abadia, Elizabeth e Cleuza, pela concepção, acolhida e orientação.

Ao José Avendanha e José Avendanha Filho, homens simples e de alma cosmopolita, inspiraram-me na escolha da carreira de Veterinário.

A Srta. Janete Silva Santos e a todas as pessoas que compuseram a equipe do Controle de Zoonoses da Pampulha entre os anos de 2001 e 2005.

Aos Drs. Silvio Rezende, Cristiano Fernandes e Maria Isabel, Gerentes da GERSA-P, GERCZO-P e GERPEPI-P, pelo apoio que deram a este trabalho.

Ao Dr Marcelo Rezende e Hugo Pereira F^o, da FUNASA, que muito colaboraram na implantação do monitoramento com ovitrampas.

Ao Prof. Álvaro Eiras, João Rodrigues e Prof^a Lirlândia, pelo auxílio e cessão de materiais indispensáveis à realização deste estudo.

Aos Professores da Escola de Veterinária pelos preciosos ensinamentos.

Aos funcionários da Escola de Veterinária, em especial à Dorací, Eduardo e Nádía, pela colaboração empenhada.

A toda equipe do RetroLab, em especial ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, Christian, Elizângela, Pedro, Gissandra, Bruno, Daniela, Fernanda e Hessen, pelo acolhimento, ensinamentos colaboração, incentivo e convívio diário.

Ao Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, pela amizade além de orientação.

EPÍGRAFE

“De tanto ver triunfar as nulidades, prosperar a desonra, crescer a injustiça, agigantar-se os poderes nas mãos dos maus, o homem chega a desanimar-se da virtude, a rir-se da honra, a ter vergonha de ser honesto...”

Rui Barbosa

“...Porém há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis.”

Bertold Brecht

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 10 |
| RESUMO | 11 |
| ABSTRACT | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1. A DOENÇA | 12 |
| 2.2. O VÍRUS | 12 |
| 2.3. O VETOR | 13 |
| 2.4. HISTÓRICO | 13 |
| 2.5. EPIDEMIOLOGIA | 14 |
| 2.6. MECANISMOS DE TRANSMISSÃO | 14 |
| 2.7. O MONITORAMENTO VETORIAL | 15 |
| 2.8. INTERAÇÃO VETOR-VÍRUS | 15 |
| 2.9. O MONITORAMENTO VIRAL | 15 |
| 2.10. TESTES DIAGNÓSTICOS E MULTIPLICAÇÃO VIRAL | 16 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 3.1. O TERRITÓRIO | 17 |
| 3.2. O MONITORAMENTO VIRAL POR MEIO DOS CASOS | 17 |
| 3.2.1. A estrutura do equipamento de saúde pública na região | 17 |
| 3.2.2. O diagnóstico e a consolidação dos casos de dengue | 17 |
| 3.3. O MONITORAMENTO DA INFESTAÇÃO VETORIAL | 17 |
| 3.3.1. As ovitrampas | 17 |
| 3.3.2. Distribuição das ovitrampas | 18 |
| 3.3.3. Número de ovitrampas instaladas | 18 |
| 3.3.4. A manutenção das ovitrampas | 18 |
| 3.3.5. O processamento do material coletado das ovitrampas | 18 |
| 3.3.6. A consolidação das informações obtidas | 18 |
| 3.3.7. Recursos humanos envolvidos no monitoramento vetorial | 18 |
| 3.3.8. Ações de controle e monitoramento vetorial paralelas | 18 |
| 3.4. O MONITORAMENTO VIRAL NOS VETORES | 19 |
| 3.4.1. Obtenção das larvas | 19 |
| 3.4.2. Manutenção das larvas em crescimento | 19 |
| 3.4.3. Identificação específica das larvas | 19 |
| 3.4.4. Preparo das larvas para o congelamento | 19 |
| 3.4.5. Estocagem e conservação das larvas | 19 |
| 3.4.6. Extração do ácido ribonucleico (RNA) em <i>pools</i> de larvas | 19 |
| 3.4.7. Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) | 19 |
| 3.4.8. Interpretação da RT-PCR | 20 |
| 3.4.9. Cálculo da taxa mínima de infestação das larvas | 20 |

| | | |
|---|---|----|
| 4 | RESULTADOS | 25 |
| 5 | DISCUSSÃO | 33 |
| 6 | CONCLUSÕES | 38 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Mapa da Região da Pampulha: Localização das unidades de saúde e referência aos principais bairros | 21 |
| Figura 2 | Ovitampa..... | 21 |
| Figura 3 | Palheta com ovos | 23 |
| Figura 4 | Mapa de Região da Pampulha: Distribuição geográfica das 205 ovitrampas instaladas | 23 |
| Figura 5 | Amplificação de RNA de vírus dengue por RT – PCR | 33 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-----------|--|----|
| Gráfico 1 | Série temporal dos índices de positividade de ovitrampa (IPO), e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005..... | 25 |
| Gráfico 2 | Série temporal dos índices de densidade vetorial (IDV) e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005 | 27 |
| Gráfico 3 | Série temporal dos índices de densidade de ovos (IDO) e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005..... | 27 |
| Gráfico 4 | Série temporal dos índices de infestação vetorial (IPO, IDV e IDO) e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2002..... | 29 |
| Gráfico 5 | Comparativo entre índices de infestação predial (IP) e índices de positividade de ovitrampa (IPO), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005..... | 31 |
| Gráfico 6 | Gráfico climatológico de médias de temperatura e precipitação em Belo Horizonte no período de 2001 a 2005..... | 31 |

ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| BOD | Baixo oxigênio dissolvido |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| FD | Febre do dengue |
| FHD | Febre hemorrágica do dengue |
| FUNASA | Fundação Nacional de Saúde |
| GERCZO-P | Gerencia Distrital de Controle de Zoonoses – Pampulha |
| GEREPI-P | Gerencia Distrital de Regulação Epidemiologia e Informação – Pampulha |
| GERSA-P | Gerencia Distrital de Saúde – Pampulha |
| Ha | Hectare |
| IDO | Índice de Densidade de Ovos |
| IDV | Índice de Densidade Vetorial |
| IP | Índice de Infestação Predial |
| IPO | Índice de Positividade de Ovitrapas |
| LI | Levantamento de Índice de Infestação Predial |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RT – PCR | PCR por transcrição reversa |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SINAN | Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação |
| TF | Tratamento focal |

RESUMO

O vírus dengue, agente da febre do dengue, depende do vetor *Aedes aegypti* para completar seu ciclo clássico homem – vetor – homem. Epidemias de dengue estão associadas a elevadas taxas de infestação pelo vetor, cujo controle é a principal forma de prevenção. O objetivo deste estudo foi avaliar o monitoramento vetorial e o viral por meio dos ovos de *Aedes aegypti* coletados, como ferramentas auxiliares no combate ao mosquito, no controle e na prevenção de epidemias por dengue. Na Pampulha, território monitorado, 205 ovitrampas foram instaladas e, no período compreendido entre a 28ª semana epidemiológica de 2001 e a 27ª de 2005, foram inspecionadas semanalmente para manutenção, coleta de ovos para contagem e eventual especificação. Os três índices obtidos: Índice de Positividade de Ovitrapas (IPO), Índice de Densidade Vetorial (IDV) e Índice de Densidade de Ovos (IDO) foram pareados com as notificações de casos de dengue e analisados em gráficos por séries temporais, o que possibilitou a identificação dos níveis de infestação vetorial associados ao favorecimento da circulação viral. Os índices sugeridos como limite entre situações de risco e controle foram, respectivamente, 40 para IDV e 60 para IPO e IDO. O monitoramento viral, resultante da pesquisa de larvas infectadas, não detectou circulação viral nos vetores amostrados, resultado coerente com os poucos casos de dengue confirmados no período. A associação observada entre os níveis de infestação vetorial e circulação viral confirma esse monitoramento como importante ferramenta de vigilância, pela capacidade demonstrada em indicar risco de epidemia. O acompanhamento contínuo dos níveis de infestação vetorial juntamente com a possibilidade de monitorar a circulação viral através de pesquisa viral nas larvas obtidas dos ovos coletados justificam a implantação e a manutenção desse tipo de monitoramento.

Palavras chave: Aedes; Dengue; Monitoramento; Infestação

ABSTRACT

Dengue Virus, agent of dengue fever, depends on the vector *Aedes aegypti* to complete his classical cycle, man – vector – man. Dengue epidemics are associated with high rates of infestation by the vector, whose control is the main way of prevention. The aim of the present study was monitoring the vector and the virus through the number of *Aedes aegypti* eggs collected as an auxiliary in the fight against the mosquito, control and prevention of Dengue epidemics. In Pampulha, the area that was monitored, 205 ovitraps were installed and, in the period from the 28th week of 2001 to the 27th week of 2005, were inspected weekly for maintenance, egg collection counting and specification. The three indexes obtained: (OPI) ovitrap positivity; (EDI) egg density and (VDI) vectorial density were associated to Dengue fever notifications and analyzed in graphics by time series, fact that enabled the identification of the levels of vector infestation connected to the favoring of viral circulation. The values for the indexes chosen to indicate the limit between risk and control situations were 40 for IDV and 60 for IPO and IDO. The viral monitoring, through the search of infected larva, did not detect any viral circulation in the vector samples, a result that is consistent with the low level of Dengue fever cases confirmed in that period. The association observed between the levels of vector infestation and viral circulation point out that vectorial monitoring by the use of ovitraps is an important tool in dengue surveillance for its ability to indicate risk of epidemics. The continuous follow-up of the levels of vectorial infestation and the possibility of monitoring viral circulation through the search of virus in the larva obtained from the eggs collected justify the set up and maintenance of this kind of procedure.

Key words: Aedes; Dengue; Monitoring; Infestation

1. INTRODUÇÃO

A febre do dengue é considerada uma arbovirose de importância mundial, pela extensão geográfica em que ocorre e pelo número de vítimas que faz anualmente (Dengue, 1997). O vetor associado à transmissão do vírus no Brasil é o mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), embora esteja presente no território nacional o *Aedes albopictus*, incriminado como vetor de importância epidemiológica na Ásia. Epidemias de dengue são uma ameaça às localidades onde estão presentes o vírus e o vetor; o combate a este é, atualmente, a principal maneira pela qual se controla a doença, para a qual não há tratamento específico e ainda não se dispõe de vacina efetiva.

Assim sendo, o conhecimento da dinâmica da população vetorial seria a via para planejar e formular estratégias eficazes de controle. Os níveis de infestação relacionam-se com a intensidade da circulação viral, o que possibilita estimar os riscos de epidemia, caso os níveis de infestação sejam associados às notificações de casos da doença ou à detecção dos níveis de infecção viral nos vetores. O acompanhamento ininterrupto dos níveis de infestação possibilita também verificar o impacto de determinadas políticas ou ações de controle sobre a população vetorial a curto e a longo prazos.

Buscando avaliar o monitoramento vetorial e o monitoramento viral, em amostras de vetores, como ferramentas auxiliares no combate ao *Aedes aegypti*, no controle e na prevenção de epidemias de dengue, realizou-se este estudo na região da Pampulha, município de Belo Horizonte – Minas Gerais, Sudeste do Brasil. O sistema de monitoramento vetorial foi baseado em armadilhas do tipo ovitrampa e planejado para produzir a cada semana dados sobre os níveis de infestação, de modo a proporcionar o acompanhamento contínuo dos mesmos. Esse tipo de monitoramento foi escolhido por ser recomendado pela Organização Mundial de Saúde (Dengue, 1997), ser considerado mais sensível e

econômico em relação a outras metodologias de monitoramento, por proporcionar informações contínuas, permitir o conhecimento detalhado da dinâmica da população vetorial na área monitorada e por registrar a evolução temporal da infestação. A obtenção de ovos em amostras representativas do território proporciona material para pesquisa de infecção viral nos vetores, constituindo uma alternativa ao monitoramento da circulação viral, usualmente feita por meio da pesquisa sorológica ou do isolamento viral em indivíduos supostamente infectados pelo vírus dengue.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A DOENÇA

A dengue é uma doença viral, febril e aguda, conhecida como febre do dengue (FD). Eventualmente pode apresentar-se sob a forma mais grave, conhecida como dengue hemorrágica ou febre hemorrágica do dengue (FHD), podendo evoluir para um quadro conhecido como Síndrome do Choque do Dengue, que pode levar a óbito, assim como a forma clássica pode passar despercebida nas infecções assintomáticas (Shepherd e Hinfey, 2006). A transmissão de uma pessoa para outra é feita por meio de vetores, advindo desse fato a sua classificação como arbovirose, palavra derivada do termo “*arthropod born virus*” (Neves, 2003). O dengue é, atualmente, a arbovirose de maior importância no mundo (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2002; Dengue, 2001).

2.2. O VÍRUS

O vírus dengue pertence à Ordem Nidovirales, Família Flaviviridae, Gênero *Flavivirus*. É envelopado e possui formato esférico com diâmetro entre 40 e 60nm. O genoma é composto de fita simples de RNA de polaridade positiva. (Cecílio, 2002; Dengue, 2001). É classificado em 4 sorotipos distintos: Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 e Dengue 4.

2.3. O VETOR

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um inseto da Ordem Diptera, Família Culicidae. Essa espécie é também o principal vetor urbano da febre amarela. É considerado um mosquito cosmopolita, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais; no Brasil, está restrito a áreas urbanas (Biologia, 1998). Possui comportamento antropofílico e prefere depósitos artificiais como criadouros, que são os responsáveis pela manutenção das populações do vetor em meio urbano. A oviposição ocorre durante o dia, e a deposição dos ovos é feita na parede do criadouro, ligeiramente acima da superfície da água ou, eventualmente, direto na superfície desta. O ciclo vital compõe-se de quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto, sendo que a fase de larva completa-se em dez dias quando as condições são favoráveis (Gadelha e Toda, 1986). Estudo recente constatou sua capacidade de dispersão superior a 800 metros em um período de seis dias (Honório *et al.*, 2003), enquanto outros pesquisadores citam a capacidade de deslocamento em até 3km feito pelas fêmeas em busca de sítios favoráveis à oviposição (Dengue, 2001).

2.4. HISTÓRICO

os primeiros registros históricos de dengue mencionam a Ilha de Java, em 1779, e Filadélfia, na América do Norte, em 1780. No século XIX há referência a epidemias ocorridas no Caribe e na Austrália. Também várias epidemias ocorreram no século XX na Europa, África e Américas. Após a Segunda Guerra Mundial registram-se epidemias de FHD no sudeste asiático (Dengue, 2001).

A transmissão do dengue foi, segundo Cecílio (2002), descrita por Bancroft em 1906 e a existência de diferentes sorotipos foi estabelecida por meio de estudos de neutralização (Dengue, 2001; Manual, 1996).

O dengue disseminou-se nas décadas de 80 e 90 pelas regiões tropicais de todo o mundo, principalmente em áreas urbanas.

Mais de 100 milhões de casos de dengue clássico são estimados e cerca de 450 mil casos de FHD são reportados por ano. Aproximadamente três bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para a epidemia por dengue (Dengue, 1997).

No Brasil, a primeira epidemia em que se conseguiu o isolamento viral ocorreu em Boa Vista, Roraima, onde circularam os sorotipos 1 e 4 (Osanai *et al.*, 1983 citado por Teixeira *et al.*, 2005). Após 1986, houve uma elevação na frequência de epidemias e a expansão geográfica tanto do vetor quanto do vírus. Os sorotipos 1 e 2 foram incriminados, respectivamente, pelas grandes epidemias ocorridas na cidade do Rio de Janeiro em 1986 e 1990 (Penna, 2004), e o sorotipo 3 que foi detectado em Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, no ano 2000 (Nogueira *et al.*, 2001), causando epidemia naquela cidade em 2001 e 2002. Atualmente os três sorotipos têm sido isolados em diversas localidades do país (Teixeira *et al.*, 2005). Segundo a mesma pesquisadora, a reinfestação pelo sorotipo 4 no país é iminente, devido à intensa ligação por via aérea e marítima a países afetados.

O papel do mosquito *Aedes aegypti* como vetor de doenças humanas foi demonstrado entre os anos de 1900 e 1901 em Cuba (Gadelha e Toda, 1986), por uma comissão do exército norte-americano chefiada por Walter Reed, encarregada de estudar a febre amarela. Esse vetor foi combatido pela primeira vez, no Brasil, em 1902, na cidade de Sorocaba, São Paulo, por Emílio Ribas e Adolfo Lutz, (Natal, 2000) após uma bem sucedida campanha contra a infecção amarílica realizada por Willian Gorgas, no ano de 1901, em Havana, combatendo unicamente o vetor. Em 1903, o sanitário Oswaldo Cruz inicia a campanha contra a febre amarela no Rio de Janeiro, doença que, tendo sido debelada na primeira década, retornaria em 1928, quando as ações de combate ao vetor já não eram mais praticadas naquela cidade. Em 1929, o Brasil firma um contrato com a Fundação Rockefeller para combate ao vetor. Em 1947 inicia-se a utilização de dicloro - difenil - tricloroetano, o DDT. Em 1955, são erradicados no Brasil os últimos focos do

Aedes aegypti, e, em 1957, o Brasil declara na Conferência Sanitária Pan-Americana a erradicação do citado vetor. O mosquito foi reintroduzido no norte do Brasil e eliminado novamente durante a década de 1960, até que em 1976 foi detectado em Salvador, Bahia, e, no ano seguinte, no Rio de Janeiro. A partir daquela data, o *Aedes aegypti* reinfestou o Brasil, estando presente na atualidade em todos os estados da Federação (Franco, 1961; Manual, 1996).

Em 1986 o vetor *Aedes albopictus* foi detectado no Rio de Janeiro e vem se dispersando pelo território nacional. É também vetor da febre amarela e do dengue, contudo não é considerado no Brasil um bom transmissor deste (Manual, 1996).

2.5. EPIDEMIOLOGIA

Epidemias de FD / FHD têm sido relatadas nas mais diversas localidades do mundo e do Brasil, nas mais variadas prevalências e proporções. Segundo Figueiredo (1996), entre março de 1986 e junho de 1996, notificaram-se no Brasil 579.037 casos. Em Belo Horizonte, Minas Gerais, a maior epidemia ocorreu em 1998 quando foram notificados 86.893 casos, sendo que estudos sorológicos realizados entre dezembro de 1999 e janeiro de 2000 apontaram a proporção de cinco pessoas infectadas para cada caso notificado (Pessanha *et al.*, 2002). Estudo semelhante em Paraíso, São Paulo, relatou uma proporção de 11 soropositivos para cada caso diagnosticado (Scandar *et al.*, 2003). Nesses estudos, evidenciou-se que um percentual elevado da população permaneceu susceptível à doença, 77% em Belo Horizonte e 96,3% em Paraíso. Em Salvador, Bahia, um estudo sorológico feito nos anos de 1998 e 1999, em diferentes áreas da cidade, encontrou soroprevalência média de 68,7%, variando entre 16,2% e 97,6%. A variação da soroprevalência não demonstrou associação com fatores como educação, renda ou sexo, mas demonstrou forte correlação positiva com densidade populacional. Tendo a última grande epidemia naquela cidade sido registrada no ano de 1996, a pesquisadora atribui a

elevada soroprevalência encontrada a uma epidemia silenciosa da doença (Teixeira *et al.*, 2002). No Rio de Janeiro, onde ocorreram várias epidemias em intervalos relativamente curtos, houve uma demonstração da elevada capacidade de circulação viral face a condições favoráveis (Nogueira *et al.*, 1999; Shatzmayr, 2000).

2.6. MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

O ciclo clássico da doença é descrito como transmissão de um homem a outro por meio da picada do mosquito. Após um período de incubação extrínseco ou de replicação do vírus no mosquito (8 a 12 dias a partir do repasto infectante), o mosquito está apto a transmitir o vírus a outro indivíduo durante os próximos repastos sangüíneos (homem – vetor – homem). A infecção transovariana e a sexual entre os vetores são variáveis ao ciclo clássico da doença e podem ser importantes na manutenção do vírus quando o fechamento do ciclo clássico fica comprometido pela baixa densidade vetorial (Kow *et al.*, 2001; Pessanha *et al.*, 2002). Os relatos de taxas de transmissão transovariana são bastante variáveis, entre 2,4% e 19,7%, quando as fêmeas são 100% positivas (Joshi *et al.*, 2002), com taxas estáveis de infecção transovariana entre 13% e 11,6%, entre a 3ª e a 7ª geração, em um estudo em que se acompanharam fêmeas infectadas por via transovariana por sete gerações consecutivas. Segundo Rosen *et al.* (1983), observaram-se taxas entre 1/200 e 1/4470, dependendo da espécie do vetor, do sorotipo e da linhagem do vírus, tendo considerado essas taxas suficientes para a manutenção do vírus sem a necessidade de hospedeiros vertebrados, ao menos por determinados períodos. Ainda segundo esses pesquisadores, as maiores taxas de transmissão foram encontradas em *Aedes albopictus*. A taxa de infecção de larvas oriundas de coleta a campo em Pompeu, Minas Gerais, foi de 1:84 (Cecílio, 2002), enquanto Evangelista (2003) encontrou, em estudos realizados em Belo Horizonte, Minas Gerais, 12 *pools* positivos em 69 analisados. A taxa de infecção encontrada em indivíduos machos coletados a campo variou de 1,33% a 2,15% entre machos coletados em uma região com altas

incidências de dengue e densidade vetorial (Kow *et al.*, 2001). A estratégia de pesquisa em machos reflete a taxa real de transmissão transovariana, já que estes não possuem hábitos hematofágicos, e a susceptibilidade ao vírus é semelhante para machos e fêmeas (Mitchell e Miller, 1990; citado por Kow *et al.*, 2001).

2.7. O MONITORAMENTO VETORIAL

No Brasil, o Ministério da Saúde, que promove as ações de controle do dengue, adota como ferramenta oficial de monitoramento de infestação o Índice Predial (IP), que fornece, baseado em pesquisa de larvas, a proporção de imóveis com criadouros (Gomes, 1998; Controle, 1994). O Índice de Breteau, que é obtido por meio de uma pesquisa mais detalhada, também baseada em pesquisa larvária, é muito citado como uma opção de monitoramento. Este índice representa a densidade larvária (Controle, 1994).

A vigilância por meio de ovitrampas, que são armadilhas distribuídas espacialmente e indicam a presença e a densidade populacional do vetor por meio dos ovos nela depositados (Braga *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 1993; Mogi *et al.*, 1988) e o geoprocessamento, destacando as áreas onde ocorrem a maior densidade populacional do mosquito e onde se concentram os casos notificados de dengue (Ali *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2002), são metodologias que vêm sendo utilizadas para a obtenção de informações que possibilitem avaliar o risco de ocorrência de epidemias e empregar de modo eficiente os recursos disponíveis, buscando evitá-las ou minimizar seus efeitos.

2.8. INTERAÇÃO VETOR-VÍRUS

Na população vetorial, a susceptibilidade ao vírus pode variar, tanto devido a fatores virais (sorotipo, linhagem) quanto a fatores vetoriais (espécie, linhagem). Castro *et al.* (2004) encontraram susceptibilidade à infecção oral de 36,7% para *Aedes albopictus* e 32,8% para *Aedes aegypti*. Alguns relatos têm apontado o dengue como um agente mórbido também entre

esses vetores. Rosen *et al.* (1983) encontraram maior proporção de larvas infectadas entre aquelas que apresentavam o desenvolvimento retardado. Joshi *et al.* (2002), em um estudo mais detalhado, mensuraram o efeito da infecção em vários aspectos relativos às larvas e aos adultos, tais como o prolongamento da fase de larva e mortalidade larvária, capacidade de oviposição das fêmeas, viabilidade dos ovos postos, entre outros, demonstrando um desempenho bastante inferior dos indivíduos infectados por via transovariana, quando comparados ao desempenho do grupo-controle. Também Rosen e Gubler (1974) detectaram elevada mortalidade, após o sétimo dia da infecção, em adultos inoculados por via parenteral com títulos elevados de vírus.

Ainda não é bem conhecido o mecanismo pelo qual a taxa de infecção se eleva entre os mosquitos antes que ocorra a epidemia, se é devido a fatores intrínsecos a eles como transmissão vertical ou sexual, ou à contaminação clássica durante o repasto sangüíneo, já que a proporção de soropositivos para casos notificados da doença é elevada, ou ainda se pelo conjunto desses e outros fatores desconhecidos.

2.9. O MONITORAMENTO VIRAL

Este tipo de monitoramento usualmente ocorre de duas maneiras: em pessoas com suspeita de FD ou FHD, por meio de isolamento viral ou pesquisa de anticorpos específicos em soro, ou em mosquitos. O primeiro, é feito em todo o território nacional, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que promove, na rede pública de saúde, o diagnóstico e consolida as notificações da doença com a Vigilância Epidemiológica por meio do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). Esse registra as informações sobre as doenças que, como a FD e a FHD, são de notificação obrigatória (Protocolo, 2005; Corrêa *et al.*, 2005).

O monitoramento viral nos vetores não foi ainda estruturado para utilização no controle do dengue. Para tanto, seria necessária a obtenção das amostras dos vetores,

coletadas de maneira representativa para a localidade que se deseja monitorar e com a periodicidade ajustada à frequência com que as informações devem ser obtidas. Também o material coletado deverá ser adequado ao teste a que será submetido, e a conservação, cuidadosa até o processamento. Segundo Chow *et al.* (1998), a vigilância viral para dengue intra e interperíodos epidêmicos constitui uma ferramenta importante para a pré detecção de epidemias, uma vez que o vírus pôde ser detectado entre os vetores cerca de seis semanas antes das epidemias de dengue ocorridas em 1995 e 1996 em Singapura. Os vírus foram detectados e sorotipados utilizando o teste *semi-nested reverse transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR). Esse teste foi sensível para detectar até uma cabeça de mosquito infectado entre 59 cabeças de mosquitos não infectados. Enquanto Lourenço-de-Oliveira (2002) em Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, em um estudo que durou de julho de 2000 a junho de 2001, em vetores adultos, capturados em 35 bairros do município, conseguiu isolar apenas o sorotipo 3, nos meses de abril e maio de 2001, apesar da conhecida co-circulação dos sorotipos 1 e 2 e do pico de densidade vetorial ter ocorrido de janeiro a março. Neste estudo a vigilância viral e entomológica foi considerada de extrema importância, devido à epidemia por dengue 3 e a sua dispersão para outras regiões do país, que ocorreram no verão seguinte.

2.10. TESTES DIAGNÓSTICOS E MULTIPLICAÇÃO VIRAL

A multiplicação viral pode ser feita em cérebro de camundongos ou em células de mamíferos, o que, dependendo do sorotipo e da linhagem, torna necessária a adaptação do vírus. Rosen e Gubler (1974) propuseram a replicação viral em mosquitos, onde um bom título de vírus pode ser conseguido no sétimo dia a partir da inoculação. A multiplicação do vírus pode ser obtida mais facilmente em cultivos de células modificadas de *Aedes albopictus*, linhagem C6/36.

Para diagnóstico de dengue, a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Controle, 1994) recomenda um dos seguintes procedimentos:

- isolamento viral em soro ou amostras de necropsia;
- demonstração de um aumento de quatro vezes ou mais nos títulos de anticorpos IgG ou IgM para um ou mais antígenos do vírus dengue, com intervalo de 14 a 21 dias;
- demonstração de antígenos em tecidos oriundos de necropsia ou soro, por imunohistoquímica, imunofluorescência ou por detecção do ácido nucléico viral;
- detecção de IgM específica associada ao quadro clínico característico, em amostras de soro obtidas a partir do 7º dia da doença. Na prática, o teste sorológico mais utilizado é a reação imunoenzimática de captura de IgM (MAC ELISA), que não identifica o sorotipo. Para sorotipagem, após o isolamento viral, utiliza-se o teste de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais.

Reações de RT-PCR ainda não são realizadas como rotina, contudo algumas vantagens em relação à utilização das mesmas, como rapidez de diagnóstico e sorotipagem, capacidade de detecção de pequena quantidade de material viral, entre outras, vêm sendo citadas (Castro *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 1998; Miagostovich *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2001). As reações RT-PCR são baseadas na purificação do RNA, cuja técnica utilizada com maior frequência é a descrita por Boom *et al.* (1990), e na técnica de RT-PCR desenvolvida por Lanciotti *et al.* (1992) para os quatro sorotipos do vírus dengue.

Kumaria e Chacravarti (2005), utilizando argumentos baseados em diversos estudos, também descreveram semelhantes vantagens da reação de RT-PCR em relação às técnicas baseadas em sorologia. Em um estudo comparativo entre RT-PCR

multiplex, desenvolvido por Harris *et al.* (1998) modificado, e RT-PCR semi-nested em duas etapas, desenvolvido por Lanciotti *et al.* (1992) para detecção e sorotipagem do vírus dengue, escolheu-se o primeiro, devido à rapidez, facilidade de execução, precisão e sensibilidade. O teste identificou até dois sorotipos diferentes em uma mesma amostra, tal como fora descrito anteriormente por Rocco *et al.* (1998), que efetuou diagnóstico de infecção concomitante por dengue dos sorotipos 1 e 2 em um mesmo paciente. Na comparação seguinte, feita com o cultivo celular, que é considerado o teste ouro para diagnóstico de dengue, encontrou-se na RT-PCR multiplex sensibilidade consideravelmente maior, com a mesma especificidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. O TERRITÓRIO

O presente estudo foi realizado na região da Pampulha, localizada a 19°51'06"S e 43°57'03" W (Resumo, 2006), no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, sendo uma das nove subdivisões administrativas. Essa região compreende 42 bairros distribuídos em uma área de 45,90Km² e abriga uma população de 141.853 habitantes. Caracteriza-se por uma ocupação predominantemente horizontal, com maior proporção de casas em relação a prédios de apartamentos (Anuário, 2003).

3.2. O MONITORAMENTO DA CIRCULAÇÃO VIRAL POR MEIO DOS CASOS NOTIFICADOS DE DENGUE

3.2.1. A estrutura da saúde pública na região

A região da Pampulha possui uma estrutura executiva e administrativa que representa a prefeitura e suas diversas secretarias em nível regional, a Secretaria de Administração Regional da Pampulha, SARMU-P. Nesta estrutura a Gerência de Distrito Sanitário da Pampulha, GERSA-P, reproduz as ações da Secretaria Municipal de Saúde, à qual está subordinada. Gerências de segundo nível ligadas à

GERSA-P executam ações de vigilância sanitária, GERVIS-P; ações de controle de zoonoses, GERCZO-P; ações de regulação, vigilância epidemiológica e informação, GEREPI-P; e ações de atenção à saúde, GERASA-P. O atendimento ao usuário é realizado em oito unidades básicas (centros de saúde), que executam ações de promoção à saúde, e na Unidade de Pronto Atendimento, UPA-P (Fig. 1).

3.2.2. O diagnóstico e a consolidação dos casos de dengue

Para que um caso de dengue seja confirmado e passe a fazer parte das estatísticas como tal, é necessário que seja diagnosticado por exames laboratoriais, sorologia ou isolamento viral. A coleta de material para exames laboratoriais é realizada em indivíduos atendidos na rede pública e considerados suspeitos de dengue (Protocolo, 2005) ou em indivíduos sob investigação por notificação de dengue. O dengue está na lista dos agravos de notificação obrigatória do SINAN. As informações sobre os agravos à saúde na região da Pampulha são consolidadas pela GEREPI-P.

3.3. O MONITORAMENTO DA INFESTAÇÃO VETORIAL

3.3.1. As ovitampas

São artefatos que simulam sítios de postura atrativos às fêmeas de culicídeos (Fay e Perry, 1965). As ovitampas utilizadas foram fornecidas pela FUNASA e pelo Laboratório de Culicídeos do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Eram em formato cilíndrico, confeccionadas em plástico opaco negro, com diâmetro de 10cm e capacidade para um litro (Fig. 2). Perfurações nas paredes laterais a dois terços da altura do recipiente a partir do fundo são destinadas a drenar o excesso de água advinda de chuvas. Tal recipiente é abastecido com aproximadamente 500ml de uma solução contendo 90% de água de torneira e 10% de um fermentado de água e capim (100g de *Panicum maximum* deixados de molho por sete dias em dez litros de água), este último com a função de aumentar a

atratividade para o vetor (Eiras, 2000; Zahiri, 1997). A palheta (Fig. 3), um pedaço de madeira aglomerada com uma das superfícies rugosa, em formato retangular no tamanho 120 X 20 X 2mm, é afixada verticalmente na parede lateral interna com um clipe de modo que a mesma mantenha a face rugosa livre e a extremidade inferior submersa na fase líquida, constituindo o substrato preferencial de oviposição.

3.3.2. Distribuição das ovitrampas

Considerando as características de dispersão do vetor (Honório *et al.*, 2003) e buscando obter uma distribuição homogênea na área a ser monitorada, utilizou-se como alternativa a metodologia recomendada pela FUNASA (Dengue 2001), que sugere a distribuição das ovitrampas por grupos numéricos de domicílios ou quarteirões, a distribuição por área (uma ovitrampa para cada 16Ha). Mapas da região com escalas conhecidas foram divididos em quadrados com lado correspondendo a 400m. No centro de cada quadrado, foi obtida a referência para a instalação da ovitrampa (Fig. 4). Cada local foi, então, visitado para que em um imóvel, preferencialmente habitado, se instalasse a armadilha sempre na área externa do mesmo (Dibo, 2005), em locais sombreados e elevados do chão entre um e dois metros.

3.3.3. Número de ovitrampas instaladas

Foi determinado pela área do território monitorado; no monitoramento da Pampulha, foram utilizadas 205 ovitrampas.

3.3.4. A manutenção das ovitrampas

Foi organizada como rotina semanal, compreendendo a substituição das palhetas, a lavagem do recipiente plástico e a troca da infusão. Tais procedimentos foram adotados para que o ciclo vital do vetor não se completasse nas ovitrampas.

3.3.5. O processamento do material coletado das ovitrampas

Com o auxílio de um microscópio estereoscópico (aumento de 8x), procedeu-

se à identificação das palhetas com ovos e à contagem dos ovos. A identificação específica foi feita esporadicamente quando, após a contagem dos mesmos, estes eram submersos em água, proporcionando a obtenção de larvas, que foram identificadas quando atingiram o terceiro ou quarto estádios. As palhetas eram, ao final, destruídas por incineração.

3.3.6. A consolidação das informações obtidas

Os dados foram agrupados semanalmente, tendo como referência a data de instalação da palheta na ovitrampa e, em seguida, foram transformados em índices: Índice de Positividade de Ovitrapas (IPO) = total de ovitrampas positivas / total de ovitrampas colhidas x 100 (Gomes, 1998); Índice de Densidade Vetorial (IDV) = total de ovos / total de ovitrampas colhidas (Avendanha *et al.*, 2005); e Índice de Densidade de Ovos (IDO) = total de ovos / total de ovitrampas positivas (Gomes, 1998). Esses índices foram consolidados em gráficos, formando séries temporais representativas do período monitorado.

3.3.7. Recursos humanos envolvidos no monitoramento vetorial

Para as ações rotineiras de visita e manutenção das ovitrampas, incluindo as ações complementares de revisita em domicílios fechados e preparo do material, foi necessário um servidor (agente sanitário), equipado com veículo, trabalhando cinco dias por semana. Para a identificação das palhetas positivas e contagem dos ovos, utilizou-se o serviço de outro agente sanitário por cerca de dezesseis horas, nas semanas em que eram coletados mais ovos.

3.3.8. Ações de controle e monitoramento vetorial paralelas

O território monitorado durante o intervalo compreendido pelo presente estudo recebeu o mesmo tratamento destinado à totalidade do município de Belo Horizonte em relação às ações de controle e

monitoramento vetorial do dengue. Resumidamente, foram em média ao ano: cinco ciclos de visitas domiciliares para a realização do tratamento focal (TF), que é destinado ao combate as fases imaturas do vetor (Dengue, 2001), conjugados com orientação educativa ao morador; e três monitoramentos vetoriais por meio de pesquisa larvária, Levantamento de Índice (LI), que dá o percentual de domicílios infestados por larvas do vetor, Índice de Infestação Predial (IP) (Dengue, 2001).

3.4. O MONITORAMENTO VIRAL NOS VETORES

3.4.1. Obtenção das larvas

As palhetas coletadas das ovitrampas foram mergulhadas em água de torneira por aproximadamente 24 horas. As larvas que eclodiram foram transferidas para uma cuba com água limpa.

3.4.2. Manutenção das larvas em crescimento

Para que as larvas atingissem o 3^o ou 4^o estádios de desenvolvimento, foram mantidas por aproximadamente uma semana incubadas a uma temperatura entre 20 e 28°C, em cubas cobertas com véu de fio sintético e dentro de gaiolas teladas que proporcionavam dupla proteção contra fuga. Da eclosão ao congelamento, as larvas foram alimentadas com ração comercial para peixe peletizada.

3.4.3. Identificação específica das larvas

A identificação foi feita conforme as características específicas descritas pelo Ministério da Saúde (Resumo, 1989), em três *pools* de 100 larvas cada, de 3^o ou 4^o estádios, colhidos nas semanas 4^a, 14^a e 24^a do ano de 2005.

3.4.4. Preparo das larvas para o congelamento

As larvas em 3^o ou 4^o estádios de desenvolvimento foram lavadas três vezes em água de torneira e três vezes em solução salina tamponada (PBS). Foram

agrupadas aleatoriamente em *pools* de 50 larvas, no máximo até dez *pools*, e colocadas em tubos do tipo *ependorf* de 1,5ml. Os tubos foram identificados com rótulos que registraram a data do congelamento e o período em que os ovos foram coletados a campo. O número máximo coletado semanalmente foi de 500 larvas.

3.4.5. Estocagem e conservação das larvas

As larvas foram congeladas em solução salina fosfatada (PBS) e mantidas a -70°C em freezer (Degalier e Sá Filho, 1997).

3.4.6. Extração do ácido ribonucléico (RNA) em *pools* de larvas

O RNA do vírus dengue foi extraído com o *kit* QIAamp® Viral RNA Mini Kit, da QIAGEN, a partir de *pools* de larvas, conforme detalhado a seguir: *pools* de até 50 larvas foram macerados em 300µl de PBS e centrifugados a 8000 x g por 3 minutos; 140µl do sobrenadante foram misturados a 560µl do tampão AVL / carrier RNA por agitação e encubados a temperatura ambiente por 10 minutos; foram adicionados 560µl de etanol absoluto livre de RNase, e novamente promovida a mistura por agitação; este volume foi, então, passado através de uma minicoluna de sílica gel, por centrifugação, para que ocorresse a captura do RNA pela membrana; em seguida, foram passados sucessivamente 500µl do tampão AW1 e AW2, para retirar as impurezas; a eluição foi feita com 60µl de tampão AVE; o eluato foi aliquoteado em dois tubos com 30µl cada e estocado em freezer a 70°C negativos. Essa técnica é uma variação da extração pelo método da sílica (Boom *et al.*, 1990).

3.4.7. Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

As reações ocorreram em tubos do tipo *ependorf* de 0,5ml de capacidade, onde foram adicionados todos os reagentes necessários à realização da RT-PCR (Lanciotti *et al.*, 1992, modificado por Harris *et al.* 1998), conforme o protocolo do *kit*

utilizado, cMaster™ RT plus PCR, produzido pela *eppendorf*. O iniciador D1 senso (5' TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G 3') na concentração de 1,05µM, comum aos quatro sorotipos, além de mais quatro iniciadores anti-senso: TS1 (5' CGT CTC AGT GAT CCG GGG G 3') na concentração de 0,88µM; TS2 (5' CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3') na concentração de 1,24µM; TS3 (5' TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C 3') na concentração de 1,17µM e DEN4 (5' TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC 3') na concentração de 0,98µM, específicos, respectivamente, para os sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus dengue. Uma alíquota de 5µL do eluato contendo o RNA extraído de cada *pool* de larvas ou do sobrenadante de cultivo celular inoculado foi utilizado como material genômico molde. As reações foram programadas para um ciclo de 30 minutos a 60°C para a etapa da transcriptase reversa; outro ciclo de 2 minutos a 94°C para a etapa de desnaturação inicial; 40 ciclos de 45 segundos a 94°C; 30 segundos a 50°C; e 45 segundos a 72°C, respectivamente para as etapas de desnaturação, hibridização do iniciador e extensão da nova seqüência de

DNA, e um último ciclo de 7 minutos a 72°C para a extensão final. Os iniciadores foram reavaliados com o auxílio do programa OLIGO (Hirsch e Ribeiro, 2002).

3.4.8. Interpretação da RT- PCR

Após a finalização das reações, os fragmentos obtidos foram fracionados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, juntamente com o controle positivo, controle negativo e marcador de tamanho molecular (100pb).

A interpretação considerou o tamanho molecular dos fragmentos amplificados para a detecção e a identificação do vírus dengue em sorotipo 1 (482pb), sorotipo 2 (119pb), sorotipo 3 (290pb) e sorotipo 4 (389pb).

3.4.9. Cálculo da taxa mínima de infestação das larvas

O cálculo da taxa mínima de infecção das larvas foi feito considerando o número de *pools* positivos e o número de larvas contidas em cada *pool* (Rosen *et al.*, 1983).

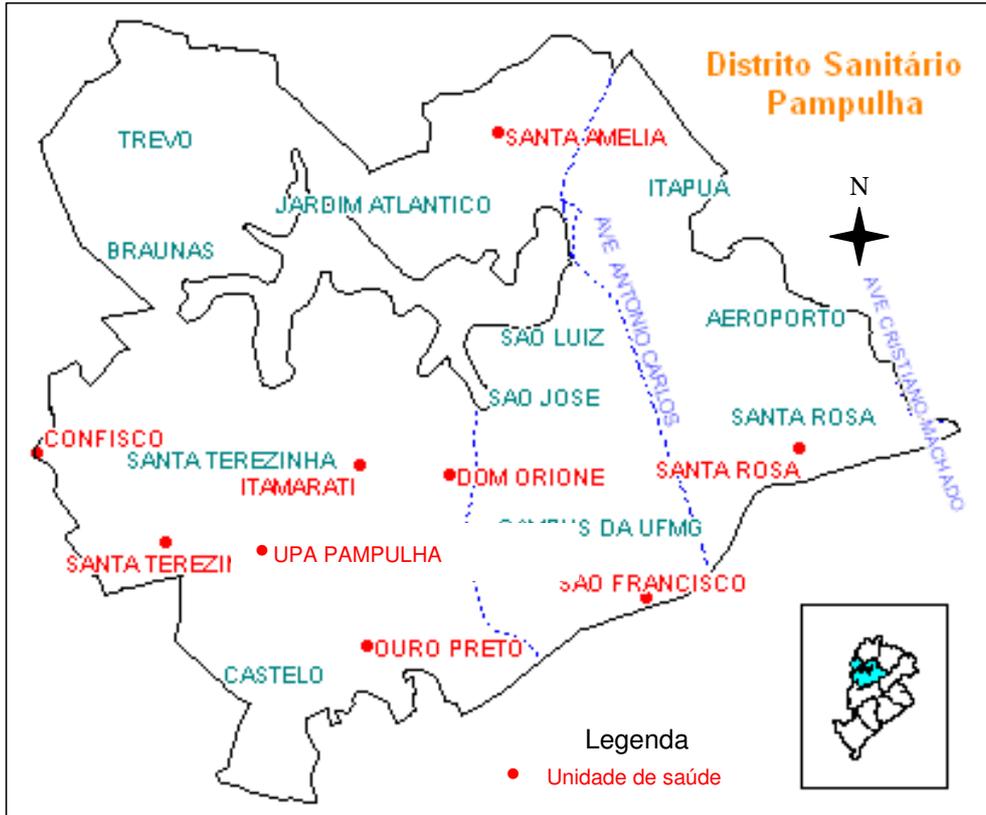


Figura 1. Mapa da região da Pampulha, Belo Horizonte - MG: referência aos principais bairros, localização das unidades básicas de saúde e da UPA Pampulha



Figura 2. Ovitrapa abastecida com solução e equipada com palheta, presa à borda com um clipe



Figura 3. Palheta com ovos

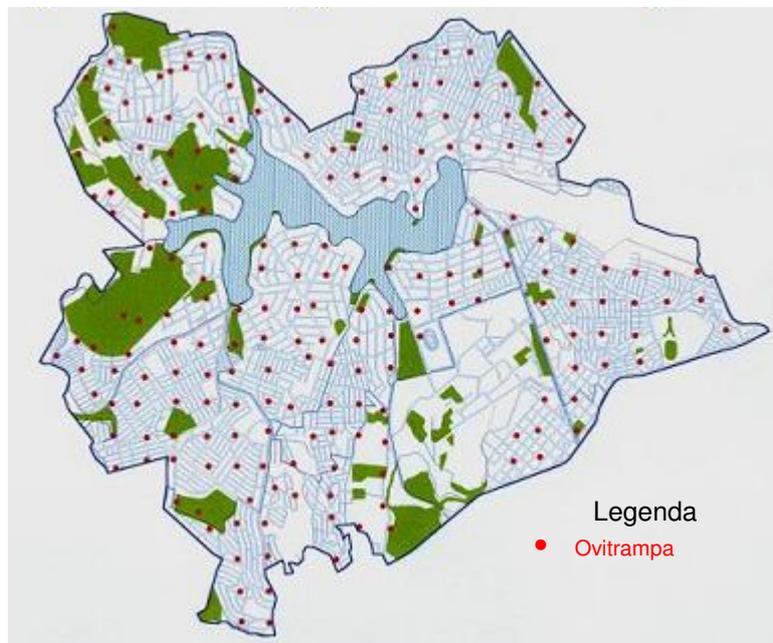


Figura 4. Mapa da região da Pampulha, Belo Horizonte - MG: distribuição geográfica das 205 ovitrampas instaladas no período de 2001 a 2005

4. RESULTADOS

Ao longo do período monitorado, foram realizados 208 ciclos semanais de pesquisa para monitoramento de infestação vetorial por ovitrampas, que produziram a cada semana três índices diferentes entre si, perfazendo 624 índices relativos aos níveis de infestação vetorial: IPO, IDV e IDO, que variaram, respectivamente, entre: 87,5 (6ª semana de 2002) e 0,49 (29ª semana de 2004); 129 (4ª semana de 2003) e 0,21 (29ª semana de 2004); 158,0 (4ª semana de 2003) e 4,3 (29ª semana de 2004). Esses índices representados por série temporal em gráficos expressaram a flutuação da infestação vetorial no período (Graf. 1, 2 e 3).

Em três *pools* de 100 larvas cada, colhidos nas semanas 4ª, 14ª e 24ª do ano de 2005, para identificação específica, todas as larvas foram identificadas como *Aedes aegypti*.

As notificações de febre do dengue (FD), utilizadas como indicador da circulação do vírus dengue, foram do mesmo modo consolidadas semanalmente, agrupadas por semana de início dos sintomas. O número máximo de notificações em uma semana foi de 45 casos (17ª semana de 2003). Essas notificações foram pareadas com índices de infestação vetorial e representadas por série temporal em gráficos para facilitar a associação entre a circulação viral e a infestação vetorial (Graf. 1, 2 e 3).

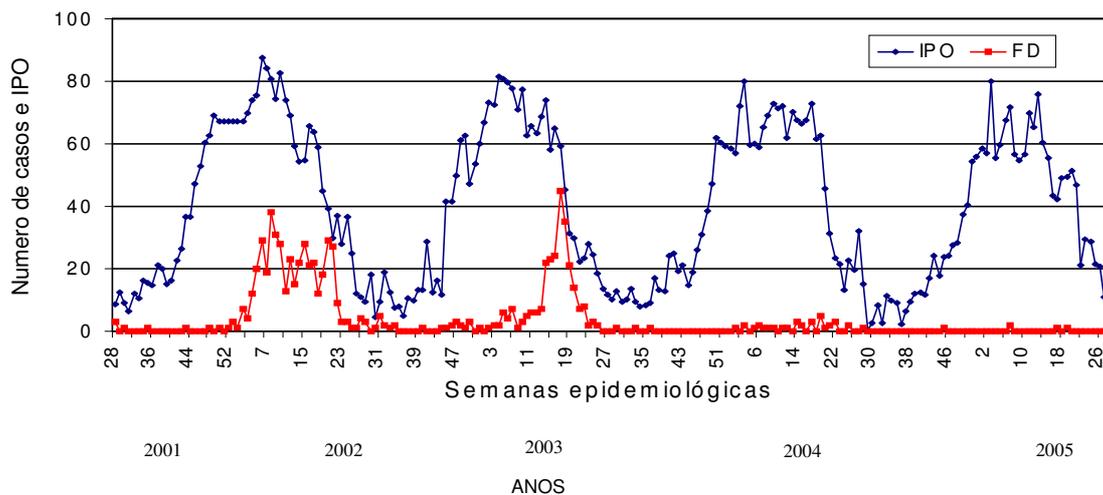


Gráfico 1. Série temporal dos índices de positividade de ovitrampa (IPO), e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005.

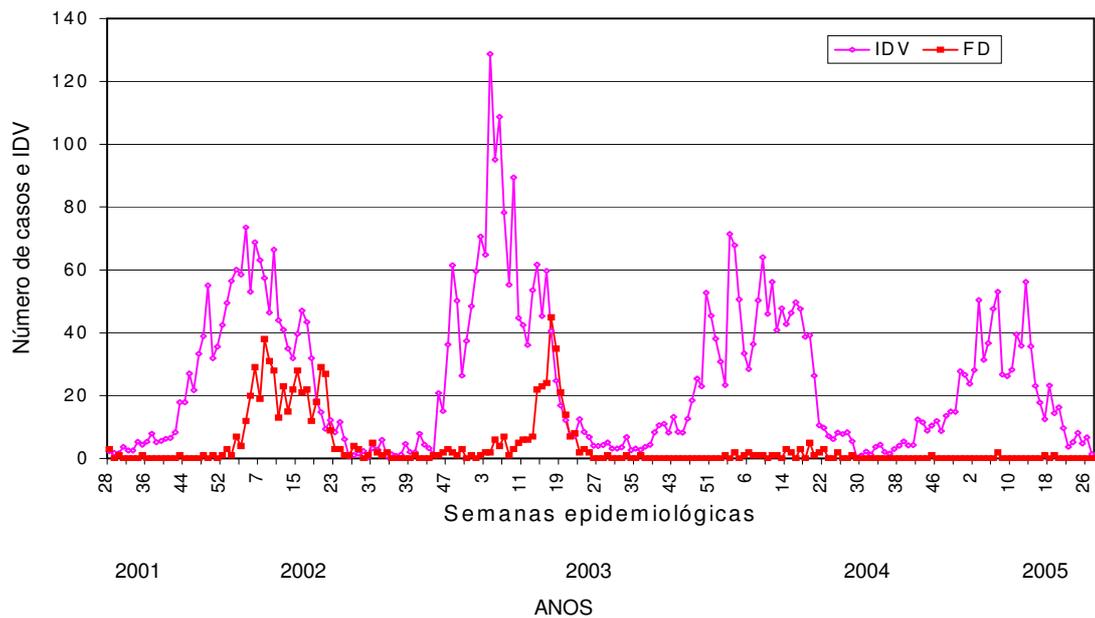


Gráfico 2. Série temporal dos índices de densidade vetorial (IDV) e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005.

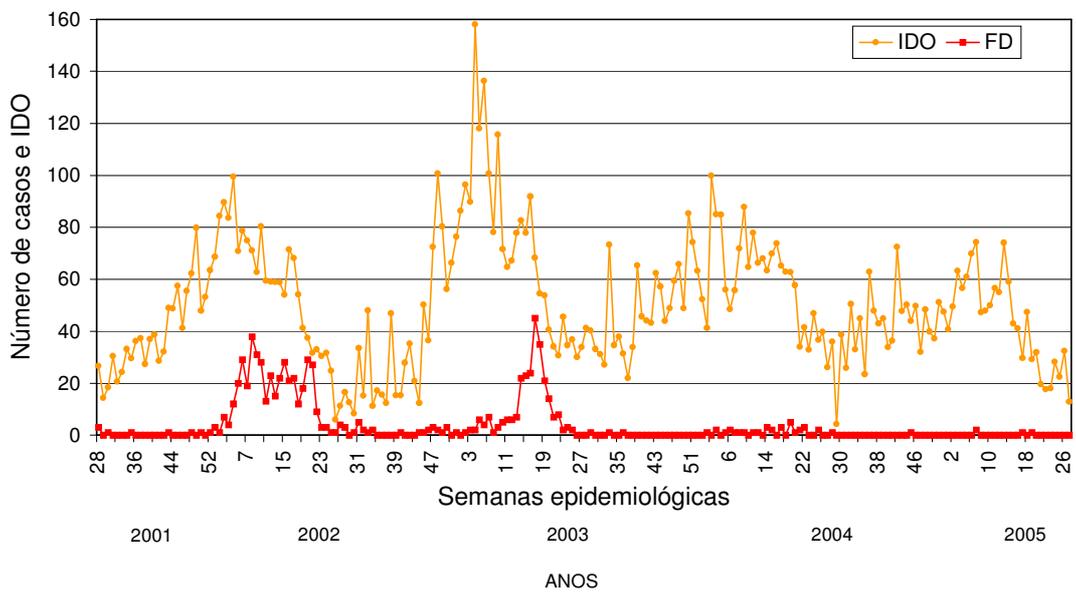


Gráfico 3. Série temporal dos índices de densidade de ovos (IDO) e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005

As três diferentes seqüências de índices de infestação vetorial e do número de notificações de FD, no intervalo da semana 28ª de 2001 até a semana 27ª de 2002, foram representadas simultaneamente em um único gráfico para realçar a distinção entre os índices, que, embora obtidos da mesma fonte e possuïrem tendências semelhantes, expressam informações diferentes a respeito da população vetorial. Neste gráfico também se observa com maior precisão em quais níveis de infestação vetorial se dá a reversão de tendência ascendente da circulação viral, conforme apresentado no gráfico 4.

Os resultados obtidos nas pesquisas larvárias para determinação de Índice de Infestação Predial (IP), as quais foram feitas no período coincidente ao que foi realizado este estudo, foram apresentadas no gráfico 5, no mesmo gráfico, foram pareados com os IPO para comparação de monitoramentos.

Um gráfico climatológico de médias mensais de precipitação (mm), e temperatura (°C) médias em Belo Horizonte, no período 2001 - 2005, foi apresentado para ilustrar o perfil climatológico da Região, fornecendo argumentos para a análise dos resultados obtidos (Graf. 6).

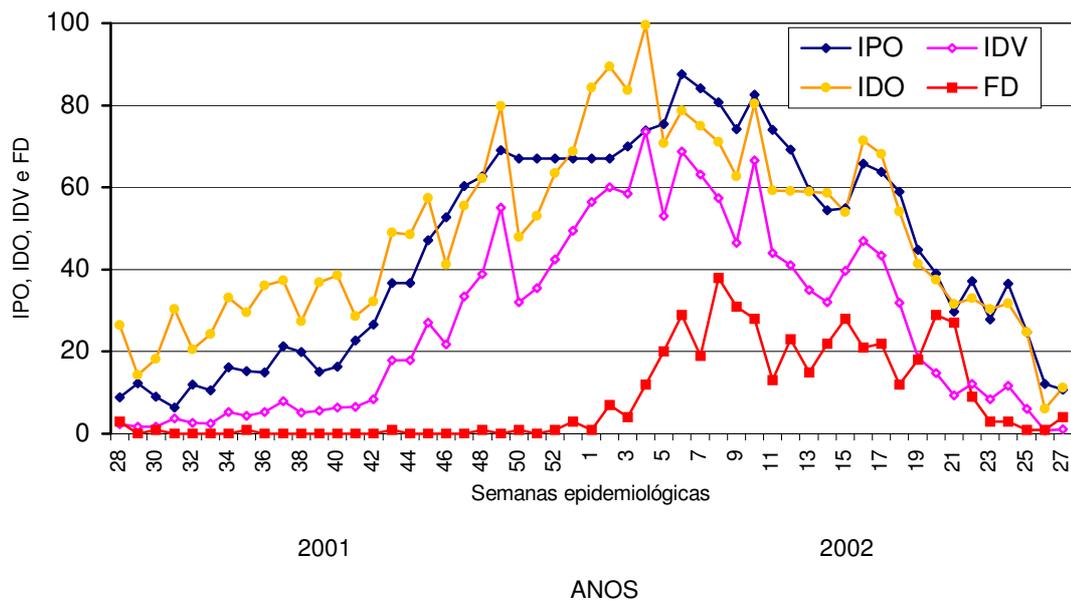


Gráfico 4. Série temporal dos índices de infestação vetorial (IPO, IDV e IDO) e das notificações semanais de dengue (FD), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2002.

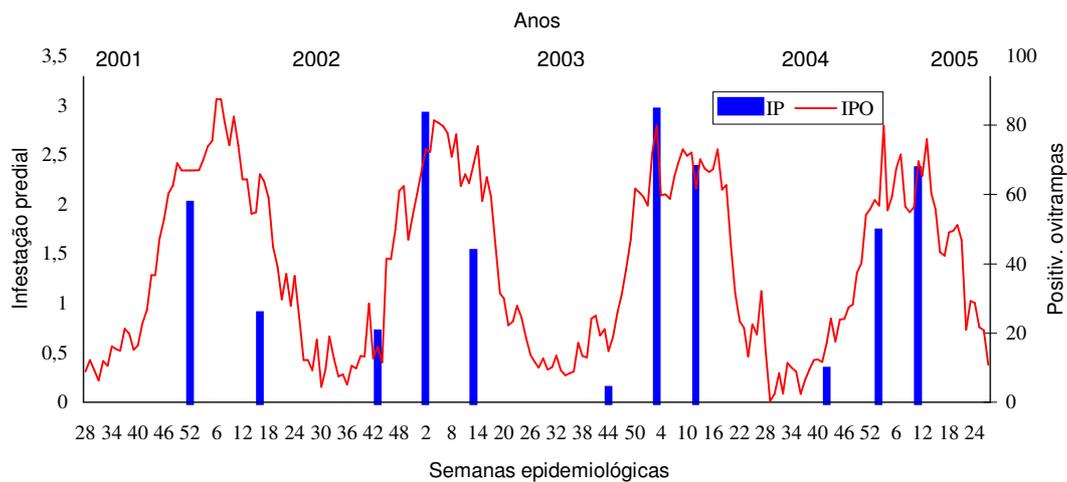


Gráfico 5. Comparativo entre índices de infestação predial (IP) e índices de positividade de ovitrapa (IPO), da 28ª semana epidemiológica de 2001 a 27ª semana epidemiológica de 2005.

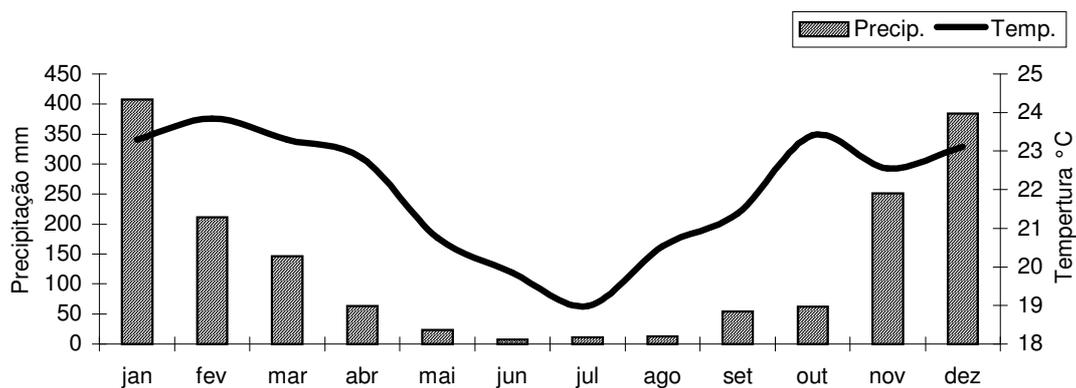


Gráfico 6. Gráfico climatológico de médias de temperatura e precipitação em Belo Horizonte no período de 2001 a 2005. Fonte: Inmet, 5° DISME

Os resultados da pesquisa viral em larvas obtidas por meio do monitoramento com ovitrampas apresentaram resultados de RT-PCR negativos em 10 *pools* de 50 larvas cada, oriundas de ovos coletados na 49ª semana de 2004; e em 10 *pools* de 50

larvas cada, oriundas de ovos coletados na 7ª semana de 2005, totalizando 20 *pools* de larvas testados. A figura 5 ilustra os resultados obtidos em testes de RT-PCR, realizados para pesquisa de vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti*.

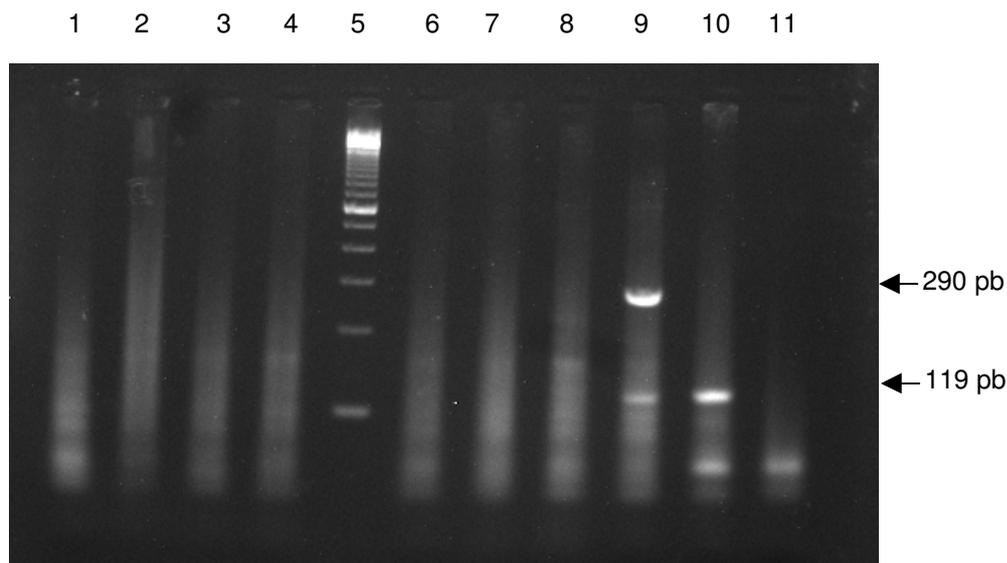


Figura 5 - Amplificação de RNA de vírus dengue por RT-PCR de amostras (pool de 50 larvas de *Aedes aegypti*) purificados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio: canaletas 01 a 04, amostras negativas; canaleta 05, padrão de tamanho molecular com 100pb (Invitrogen); canaletas 06 a 08 amostras negativas; canaleta 09, controle positivo para os sorotipos 2 e 3; canaleta 10, controle positivo para o sorotipo 2; canaleta 11, controle negativo de reagentes.

5. DISCUSSÃO

O monitoramento vetorial com ovitrampas revelou-se uma boa ferramenta para o acompanhamento da infestação vetorial, proporcionando a obtenção de dados em intervalos curtos e de modo contínuo. O acompanhamento da infestação de uma área urbana com dimensões geométricas e populacionais expressivas, ao longo de um período tão dilatado, não encontra paralelo na literatura, vindo redimir em parte o “paradoxo da escassez de dados entomológicos em relação aos outros tipos de dados” a que fizeram referência Degalier e Sá Filho (1997). O registro longitudinal dos

níveis de infestação possibilitou o conhecimento detalhado do perfil populacional do *Aedes aegypti*, inclusive sob os vieses de sazonalidade e ações de controle. A associação dos níveis de infestação obtidos com a circulação viral, detectada por meio da notificação de casos de dengue, possibilitaram a sugestão de indicadores de risco de epidemia, tendo por base os níveis de infestação detectados.

Foi constatado que esse tipo de monitoramento proporciona a obtenção de um índice equivalente ao Índice Predial (IP) (Gomes, 1998), o Índice de Positividade de Ovitrapas (IPO); ambos proporcionam a

obtenção do percentual de imóveis infestados. Os valores percentuais de infestação acusados por este índice foram maiores, porém proporcionais aos valores percentuais dos IP, conforme resultados apresentados no GRAF. 5. A diferença de magnitude encontrada entre os valores dos índices deve-se à diferença na metodologia empregada na obtenção dos mesmos: no monitoramento com ovitrampas, todas as residências visitadas possuem um nicho em condições ideais para que o vetor faça a oviposição; já no monitoramento por pesquisa larvária, muitos imóveis visitados não possuem coleções de água compatíveis com a criação de larvas, embora o vetor na fase adulta possa estar presente.

Observou-se, ainda, que a contagem dos ovos proporciona a obtenção de um índice equivalente ao Índice de Breteau (Gomes, 1998), na medida em que a média de ovos por ovitrampa, descrita por Mogi *et al.* (1990), citada como Índice de Densidade Vetorial (IDV) (Avendanha *et al.*, 2005), permite obter a noção da densidade ou da concentração de vetores em atividade. Como no Índice de Breteau, os valores do IDV são em números absolutos. Não há comparações numéricas porque o tipo de pesquisa que produz o Índice de Breteau não é realizado em Belo Horizonte.

Um terceiro índice, o Índice de Densidade de Ovos (IDO) (Gomes, 1998), é complementar aos dois índices descritos anteriormente. É o que apresenta maior oscilação de valores, pode sinalizar tendências, se for considerado que poucas armadilhas positivas podem produzir valores numéricos elevados.

Pode-se obter ainda, por meio da associação dos valores de dois ou três índices, o perfil da infestação vetorial no território. Exemplificando, caso se obtenha no mesmo período um IDV e um IPO reduzidos e um IDO elevado, isto sugere que apenas algumas frações do território estaria com elevado grau de infestação, enquanto índices elevados de IDV e IPO sugerem que há uma alta infestação vetorial acometendo grandes proporções da área monitorada.

Ao contrário, a utilização do modelo de monitoramento com ovitrampas em áreas extensas para localizar ou priorizar pequenas áreas a serem trabalhadas, ou utilizar dados de uma única armadilha para localizar criadouros de larvas, constitui equívoco tão grande quanto a utilização de dados obtidos no levantamento de Índice Predial para eleger quarteirões a serem tratados. No primeiro, se forem consideradas a capacidade de dispersão de fêmea em busca de sítios adequados de oviposição igual a 800 metros (Honório *et al.*, 2003), é possível verificar que a área de dispersão das fêmeas de apenas um foco corresponderá a exatos 200,96 hectares, área considerada extensa para o meio urbano, correspondendo à soma das áreas de 5.582 lotes de 360 metros quadrados cada um. Quanto ao segundo, não se pode questionar que o quarteirão onde as larvas foram encontradas é positivo; contudo, não é possível considerar negativo um quarteirão em que na pesquisa larvária, para levantamento de Índice Predial, não se encontrem larvas. Deve ser ressaltado que se trata de uma pesquisa amostral em que, na maioria das vezes, um único imóvel é visitado por quarteirão, o que é insuficiente para determinar que esse não está infestado, qual é o grau de infestação do quarteirão positivo e se deve ter priorizado o seu tratamento.

É sabido que fatores climáticos influenciam na densidade vetorial. Assim, cogitou-se associar a este estudo os índices médios mensais de temperatura e precipitação registrados no decorrer do monitoramento. Posteriormente, concluiu-se que tais informações seriam de pouca ou nenhuma utilidade. É conhecido que as chuvas proporcionam criadouros aos vetores, promovendo a sua multiplicação, contudo, médias de precipitação não informariam se as chuvas caíram de forma bem distribuída, ou se de forma concentrada, de uma só vez, e essas diferenças na distribuição das chuvas podem, respectivamente, favorecer ou não a multiplicação vetorial. A despeito desse e de tantos outros fatores possíveis de influenciar a dinâmica de infestação vetorial, parece coerente inverter o sentido da investigação: partindo dos níveis de

densidade de infestação vetorial, os quais refletem todos os fatores favoráveis ou desfavoráveis que atuaram sobre a população de vetores, para identificar os que estariam incrementando ou inibindo a multiplicação desses insetos.

O monitoramento realizado no primeiro ano permitiu caracterizar o perfil de infestação vetorial na região da Pampulha, fato confirmado nos anos seguintes, quando foram registrados perfis de infestação semelhantes, mas apresentando variações importantes nos valores dos índices durante o período no qual o registro de casos de dengue é mais comum. Se for considerado que as ações de controle realizadas pela Prefeitura Municipal foram constantes ao longo do período estudado, pode-se atribuir essa diferença interanual a fatores climáticos, cujo poder de influência, a variação sazonal da densidade de infestação vetorial observada ao longo do ano, é a melhor demonstração. A amplitude de variação atingiu 17.500% entre o maior e o menor dos IPO registrados, e 64.350% entre o maior e o menor IDV, sendo que essa variação pode ser atribuída em sua maioria a fatores climatológicos.

O monitoramento vetorial aqui descrito demandou um gasto mínimo de recursos humanos, tornando possível o monitoramento vetorial contínuo, inclusive e principalmente durante o curso de epidemias, o que não seria aconselhável realizar utilizando os índices baseados em pesquisa larvária nos moldes em que são trabalhados na atualidade, principalmente porque, para a obtenção dos mesmos, há a necessidade de parar as ações de controle para que o contingente que as executa possa, durante um período relativamente prolongado, realizar a pesquisa larvária. O monitoramento com ovitrampas, além de não agregar tal problema, apresenta a vantagem de desvincular a produção dos dados que proporcionarão avaliar os níveis de infestação dos indivíduos encarregados do seu controle, reduzindo a possibilidade de que venha a ocorrer manipulação de dados.

Braga *et al.* (2000) apontaram o monitoramento com ovitrampas como uma metodologia mais sensível e econômica quando comparada às metodologias de monitoramento oficiais, baseadas em pesquisa larvária. Neste estudo, verificou-se que, no período necessário à realização da pesquisa para a obtenção de um único Índice de Infestação Predial (em média uma semana somente para a pesquisa de larvas nos domicílios amostrados), emprega-se um quantitativo de recursos humanos equivalente ao que seria necessário à execução dos procedimentos completos para o monitoramento com ovitrampas, durante o período de um ano.

A sensibilidade do método pôde ser verificada neste estudo, que detectou vetores em todas as épocas do ano, mesmo no decorrer da estação seca (inverno) na região monitorada, quando o Índice de Infestação Predial usualmente não detecta o vetor, como também no verão chuvoso, concordando com Marques *et al.* (1993), que verificaram na ovitrampa a capacidade de positivar-se mesmo na presença de grande número de criadouros concorrentes.

Uma das vantagens do uso de ovitrampas, seria a retirada de ovos do ambiente (Santos *et al.*, 2003). Contudo, considerações sobre a área que cada ovitrampa representa, neste estudo corresponde a uma área de 16 Ha por ovitrampa, e o número possível de recipientes, das mais diversas capacidades, dispostos em um território urbano com tal dimensão, e que poderiam também receber oviposição, sugerem cautela quanto a análise do impacto desta ação. Embora em períodos de pico sejam retirados até cerca de 26 000 ovos por semana na região da Pampulha, as 205 ovitrampas instaladas atendem a um percentual de apenas 0,3 % dos 68.000 imóveis existentes.

Possíveis vícios de amostragem como a variação da oviposição entre as fêmeas por sítio de postura, ou a proximidade de ovitrampas em relação aos criadouros, devem ser compensados por um número amostral adequado de ovitrampas instaladas. A média de ovos por ovitrampa

deve representar os níveis de infestação em relação ao universo amostrado.

A superação da dificuldade em calcular a densidade da população adulta do vetor a partir dos índices obtidos no monitoramento por ovitrampas (Gomes, 1998), resolveu-se, neste estudo, pela associação direta dos índices de infestação (obtidos através da detecção e quantificação de ovos), com o favorecimento da circulação viral. A hematofagia, que é condição para que ocorra a transmissão do vírus do vetor ao homem, é também condição para que ocorra oviposição, o que vem associar intimamente as atividades vetorial e reprodutiva, sendo que a oviposição é a síntese da última. Desta forma, tais índices refletem tanto o grau de infestação quanto o de atividade vetorial, podendo ser potencialmente superiores a índices baseados na população adulta, devido ao relacionamento da oviposição com a hematofagia, que é o ato determinante da ação vetorial.

Os índices obtidos através da coleta e da contagem de ovos, quando utilizados para cálculo de infestação de vetores adultos, deveriam ser associados à população ovipositora e não à geração que adviria desses ovos, isto devido, além da proximidade cíclica com o adulto ovipositor, ao fato de serem a representação de uma população que deixou vestígios concretos proporcionais a sua densidade e atividade hematofágico-vetorial e sexual (ovos), e não a uma provável futura população, cuja existência estaria sujeita a um elevado grau de incertezas.

A formulação de índices simples, baseados no número de ovos coletados, no percentual de ovitrampas positivas e no total de ovitrampas trabalhadas, possibilitou obter com facilidade e confiabilidade o perfil da dinâmica populacional e a variação da densidade vetorial, sem a necessidade da adoção de métodos mais complexos, como o sugerido por Focks *et al.* (1993).

A possibilidade de utilização da ovitrampa para monitorar impactos de ações de controle, como a termonebulização,

mutirões de retirada de recipientes e outras ações de controle, ou combate, é viável, como sugeriu Mogi *et al.* (1990). Todavia, faz-se necessário montar exclusivamente um sistema amostral que represente a fração do território que se está trabalhando, com um número adequado de ovitrampas, tornando representativa e confiável a amostragem. Essa nova amostragem deverá ser independente do sistema de monitoramento da área como um todo, o qual poderá ser utilizado como controle.

Mogi *et al.* (1990) propuseram uma metodologia para obtenção de índice de infestação por meio do monitoramento com ovitrampas, baseada no número médio de ovos por armadilha, que serviria para orientar ações de controle. Quatro ovitrampas em cada domicílio, duas instaladas no intra-domicílio e duas no peridomicílio, seriam instaladas por um período de cinco dias consecutivos a cada mês. A diferença dessa metodologia para a que foi adotada neste trabalho, consistiu basicamente em aspectos como o tempo de exposição da armadilha para coleta de ovos, que foi contínuo, e em relação aos sítios de instalação de ovitrampas, apenas uma no peri-domicílio. A obtenção de índices semanais, permite o acompanhamento mais detalhado da flutuação populacional, e foi o que influenciou na opção pelo monitoramento contínuo, já que, com o aumento de duas visitas ao sítio de oviposição por mês é possível reduzir em 75% o intervalo entre a produção dos índices, quadruplicando o volume de informações. A instalação de ovitrampas no interior dos domicílios foi abolida devido à menor eficiência na detecção do vetor (Dibo *et al.*, 2005), à necessidade de agilizar o acesso à armadilha e de diminuir o incômodo ao colaborador, em cujo domicílio foram instaladas.

Mogi *et al.* (1990) também propuseram substituir a contagem de ovos, necessária para elaborar a média de ovos por armadilha (IDV), por uma estimativa por associação com a proporção de ovitrampas positivas (IPO). Por considerar a contagem dos ovos uma tarefa relativamente simples,

optou-se por evitar a utilização de um valor amostral para estimar outro, evitando os vieses implícitos a esses procedimentos.

Na região estudada, os casos de dengue concentram-se no período chuvoso, justamente quando o nível de infestação pelo vetor é reconhecidamente mais elevado. A densidade vetorial vem sendo correlacionada com a ocorrência de notificações de dengue (Corrêa *et al.*, 2005). Oliveira (1995), ao discutir a natureza matemática das variáveis com que se trabalha em investigações científicas, classifica de variável com nível de medida de razão ou proporção as variáveis como as que foram trabalhadas neste estudo, índices relativos ao vetor ou ao vírus, por serem representadas por escalas cardinais cuja origem não é arbitrária, pois o ponto zero é fixo, e os números representam diferenças fixas, cujas proporções permanecem constantes. Assim, o valor de $IDV = 40$ corresponde ao dobro de $IDV = 20$, por conseguinte, a densidade vetorial representada pelo primeiro valor é o dobro da representada pelo segundo valor; contudo, em determinadas circunstâncias, a classificação das medidas de infestação como uma variável mais simples, com o nível de medida nominal, como “situação de risco” ou de “controle” em relação à possibilidade de epidemia, não implica baixar o nível de qualidade da medida, mas associar tal medida ao que representa.

A variável “infestação vetorial” relaciona-se com outra variável, “casos de dengue”, conforme mostrado nos gráficos obtidos através deste estudo. A simples presença do vetor, como registrado nos meses de junho a outubro, ou mesmo a elevação dos níveis de infestação registrados nos meses de outubro a dezembro, não desencadeou notificações de casos da doença na mesma proporção, apesar de ser comprovada a necessidade de que haja o vetor para que ocorra transmissão do vírus. Tal relação é classificada por Oliveira (1995) como sendo uma *relação determinante*, em que a infestação vetorial é necessária, mas por si não é suficiente para produzir casos da doença, pois, para que esta ocorra, é necessária também a presença do vírus,

além de pessoas susceptíveis. Por outro lado, a ausência de vetores constitui relação invariante, ou relação causal com a doença, ou seja: na ausência do vetor, estará ausente também a doença. Considerando situações como a representada no GRAF. 4, na qual a incidência de casos de dengue esteja em ascensão, o ponto de reversão dessa tendência poderá sinalizar que níveis de infestação vetorial favorecem o aumento da incidência da doença. A reversão da tendência ascendente da circulação viral indica que, sob tais níveis de infestação vetorial, a circulação viral não está favorecida. Dessa forma, no intervalo de 2001 a 2002, quando ocorreu a mais intensa manifestação de FD na região monitorada, detectaram-se, durante o decréscimo natural dos níveis de infestação, aqueles que marcaram a reversão da tendência ascendente da incidência de FD. Esses índices, assim como os de valores menores que eles, passam a ser associados com níveis de infestação vetorial em que a circulação viral não estaria favorecida e, portanto, considerados como *índices de controle* em relação à possibilidade de ocorrer epidemia. De modo complementar, os índices com valores maiores que eles foram considerados *índices de risco*. Contudo, o risco foi considerado em relação a epidemias de FD, porque a ocorrência de casos isolados da doença foi registrada, como mostrado nos gráficos, mesmo quando a densidade vetorial estava baixa, nos níveis considerados de controle. A possibilidade de a circulação viral ocorrer, ainda que seja em níveis mínimos entre os vetores, conforme assinalaram Kow *et al.* (2001) e Pessanha *et al.* (2002), explica o eventual surgimento desses casos isolados. Dessa forma, identificaram-se para os IDVs valores indicativos de situação de risco ou controle em relação à possibilidade de epidemias, conforme estiverem, respectivamente, acima ou abaixo de 40. Para os IPOs e IDOs, a mesma interpretação teria como valor limite igual a 60.

A tendência de regressão da circulação viral, quando os níveis de infestação vetorial caíam abaixo dos valores limite dos índices citados acima, como foi observado no

intervalo 2001 – 2002, foi confirmada no intervalo 2002 - 2003, e a circulação viral foi mínima nos períodos de 2003 – 2004 e 2004 – 2005, acompanhando a redução dos índices de infestação vetorial verificada nesses períodos.

A circulação do vírus dengue entre os vetores, mesmo ocorrendo em taxas reduzidas, deveria crescer proporcionalmente à elevação da infestação vetorial; contudo, foi observado um intervalo de aproximadamente oito semanas entre a elevação da infestação vetorial e do volume das notificações de casos de FD. Tal observação sugere que as vias de transmissão transovariana ou sexual não favorecem a transmissão do vírus entre os vetores; assim, as taxas de infecção vetorial se elevam apenas quando a transmissão horizontal está favorecida por altos índices de infestação vetorial, o que aumenta a probabilidade de infecção de vetores no repasto hematofágico durante o curto período de viremia nos indivíduos acometidos por FD.

Houve dificuldade de detecção do vírus em vetores capturados a campo (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2002). Investigações que obtiveram sucesso na detecção viral em vetores, aconteceram quase sempre em material coletado próximo a moradias de pessoas doentes, em períodos de plena circulação viral (epidemia) ou em períodos que antecederam uma epidemia de dengue (Chow *et al.*, 1998), situações não detectadas na região em estudo durante o período monitorado, o que confere coerência aos resultados obtidos.

A escolha das semanas nas quais as larvas seriam examinadas baseou-se no período usual de início de notificações de dengue, que coincide com as primeiras semanas de janeiro; assim, para que fossem utilizadas como detecção precoce, as larvas foram coletadas nas primeiras semanas de dezembro, considerando que, após o início da notificação dos casos da doença, a pesquisa nos vetores para fins de monitoramento de densidade viral não mais seria justificável, uma vez que este poderia ocorrer por meio dos casos de dengue. No

entanto, o monitoramento viral nos vetores, se realizado continuamente, poderia ser utilizado como sentinela para detecção da circulação de novos sorotipos, ou simplesmente da circulação do vírus dengue em áreas indenes.

Outros fatores, segundo Mogi (1990), devem ser considerados no estudo do dengue, como a interação dos sorotipos presentes com as populações vetorial e humana, o que envolve a susceptibilidade dessas populações e a virulência dos sorotipos circulantes. A capacidade de adaptação e a multiplicação dos mesmos poderiam alterar a relação nível de infestação vetorial / favorecimento da circulação viral. Todavia, em um sistema de monitoramento de infestação vetorial, associado ao monitoramento da circulação viral, tal alteração poderia não somente ser detectada, mas também avaliada quanto ao risco potencial em relação a epidemias de FD / FHD.

Em relação a pesquisa viral nas larvas oriundas dos ovos coletados nas ovitrampas utilizadas para o monitoramento da infestação vetorial na Região da Pampulha, a não detecção do vírus dengue entre as larvas examinadas, pode ser justificada pela pequena circulação do vírus no período 2004 – 2005, período em que foram coletadas, quando apenas cinco casos foram notificados no território monitorado.

6. CONCLUSÕES

O monitoramento vetorial por meio de ovitrampas produz índices equivalentes aos produzidos pela pesquisa de infestação larvária (Índice de Infestação Predial e Índice de Breteau), com menor demanda em recursos humanos e em intervalos curtos, proporcionando o acompanhamento contínuo dos níveis de infestação, proporcionando também, material biológico (ovos) compatível com a pesquisa viral, constituindo uma alternativa de monitoramento da circulação do vírus dengue.

A associação dos índices de infestação do *Aedes* com as notificações de dengue, proporciona a identificação dos níveis de infestação vetorial que favorecem a circulação viral, possibilitando a sugestão de níveis de infestação que seriam indicadores de risco para epidemias de dengue.

O monitoramento da circulação viral na população vetorial, conforme o modelo apresentado neste estudo, apresentou menor eficiência na detecção da circulação do vírus dengue em relação ao Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). No entanto, aquela metodologia justifica-se pela possibilidade de detecção precoce do risco de epidemias, podendo ser melhor avaliada quando venha coincidir com períodos onde ocorram circulações mais expressivas do vírus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M.; WAGATSUMA, Y.; EMCH, M. *et al.* Use of a geographic information system for defining spatial risk for dengue transmission in Bangladesh: role for *Aedes albopictus* in an urban outbreak. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 69, n. 6, p. 634-40, 2003.
- ANUÁRIO estatístico de Belo Horizonte 2003. Disponível em: <<http://portal1.pbh.gov.br>> Acesso em: 29 jan 2006.
- AVENDANHA, J. S.; PEREIRA FILHO, H.; COSTA, C. F. *et al.* Flutuação da população vetorial e sua provável influência no número de notificações semanais de casos de dengue ocorridas na Região da Pampulha, Belo Horizonte, 2001/2002. *Rev. Med. Minas Gerais*. Belo Horizonte: Coopmed, 2002. v. 12, s.1, p. 20.
- AVENDANHA, J. S.; COSTA, C. F.; REZENDE, G. C. *et al.* Relation between the levels of *Aedes aegypti* infestation obtained from ovitraps analysis, and dengue virus circulation in Pampulha, Belo Horizonte, MG. *Virus Res.* Rio de Janeiro: Soc. Bras. Virol., 2005. v. 10. p. 147.
- BIOLOGIA e ecologia de *Aedes*. Rio de Janeiro: FUNASA, [1998 ?]. 10 p.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRAGA, I. A. GOMES, A. C.; NELSON, M. *et al.* Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição para detecção de *Aedes aegypti*. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v. 33, n. 4, p. 347-53, 2000.
- CASTRO, M. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; SHATZMAYR, H. G. *et al.* Dengue virus detection by using reverse transcription polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 8, p. 809-14, 2004.
- CECÍLIO, A. B. *Identificação e caracterização molecular dos vírus: dengue e febre amarela*. 2002. 101 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CHOW, V. T. K.; CHAN, Y. C.; YOUNG, R. *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, p.578-86, 1998.
- CONTROLE de vetores da febre amarela e dengue: Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1994. 28p. (Diretrizes técnicas)
- CORRÊA, P. R. L.; FRANÇA, E.; BOGUTCHI T. F. Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Saúde Pública*, v. 39, n. 1, p. 33-40, 2005.
- DEGALIER, N.; SÁ FILHO. G. C. *Curso de entomologia médica: os vetores de arbovirus nas Américas (Diptera, Culicidae)*. Disponível em: <http://www.ird.org.br/br/pesquisa/met_tecn/principa.htm> Acesso em: 21 abr. 2004.

DENGUE: instrução para pessoal de combate ao vetor, manual de normas técnicas. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001, 84 p.

DENGUE haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO, 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publication/en/>>. Acesso em 27 jan. 2006.

DIBO, M. R.; CHIARAVELLOTTI-NETO, F.; BATTIGAGLIA, M. *et al.* Identification of the best ovitrap installation sites for gravid *Aedes (Stegomyia) aegypti* in residences in mirasol, State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 4, p. 339-43, 2005.

EIRAS, A. E. The role of grass infusions as oviposition attractants and oviposition stimulants for *Aedes aegypti*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21, 2000, Brasil. Disponível em: <http://lamar.colostate.edu/~insects/physiolecol/ae_oviposition.html> Acesso em: 10 ago. 2002.

EVANGELISTA, K. S. *Estudo da transmissão vertical de dengue vírus em mosquitos do gênero Aedes no Município de Belo Horizonte*. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

FAY, R.W.; PERRY, A. S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosq. News*, v. 25, p. 276-81, 1965.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil I: History, epidemiology and research. *Virus Res.* v. 1, n. 2, p. 9-16, 1996.

FOCKS, D. A. ; HAILE, D. G. ; DANIELS, E. dynamic life table model for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) : simulations results and validation. *J. Med. Entomol.* v. 30, n. 6, p. 1018-1028, 1993.

FRANCO, O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v. 13, n. 1, p. 43-48, 1961.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. *Biologia e comportamento do Aedes aegypti*. Uberaba: Ministério da Saúde / SUS.Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Regional de Minas Gerais, [1986 ?], 5 p.

GOMES, A. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. *Inf. Epidemiol. SUS*, v. 7, n. 3, p. 49-57, 1998.

HARRIS, A.; ROBERTS, T. G.; SMITH, L. *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, p. 2634-39, 1998.

HIRSH, C.; RIBEIRO, V. V. *Tutorial para uso do programa OLIGO, versão 3.3 (em DOS)*. [S.l. : s.n.]: 2002. 6 p.

HONÓRIO, N. A.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J. *et al.* Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 2, p. 191-198, 2003.

JOSHI, V.; MOURYA, D.T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Med. Hyg.*, v. 67, n. 2, p. 158-61, 2002.

KOW, C. Y.; KOON, L. L.; YIN, P. F. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. *J. Med. Entomol.*, v.38, n.4, p.475-79, 2001.

- KUMARIA, R.; CHAKRAVARTI, A. Molecular detection and serotypic characterization of dengue viruses by single-tube multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious Disease*. 2005. Disponível em: <www.sciencedirect.com> Acesso em: 28 nov. 2005.
- LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J. *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, p.545-51, 1992.
- LIMA, V.L.C.; ANDRADE, V. R.; FIGUEIREDO, L. T. M. *et al.* Utilização do geoprocessamento para análise de inquérito soro-epidemiológico para dengue. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, 5, 2002, Curitiba-PR.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; HONÓRIO, M. G. C.; SHATZMAYR, H. G. *et al.* Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, n.6, p.799-800, 2002.
- MANUAL de dengue: vigilância epidemiológica e atenção ao doente. 2. ed. Brasília: DEOPE, 1996. 79 p.
- MARQUES, C. C. A.; MARQUES, G. R. A. M. M.; BRITO, M. *et al.* Estudo comparativo de eficácia de larvitrapas e ovitrapas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. *Rev. Saúde Pública*, v. 27, n. 4, p. 237-41, 1993.
- MIAGOSTOVICH, M. P.; SANTOS, F. B.; ARAÚJO, E. S. M. *et al.* Diagnosis of dengue by using RT-PCR. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 5, p. 596-99, 1997.
- MOGI, M.; KHAMBOONRUANG, C.; CHOOCHOTE, W. *et al.* Ovitrap Surveys of Dengue Vector Mosquitoes in Chiang Mai, northern Thailand: Seasonal Shifts in Relative Abundance of *Aedes albopictus* and *A. aegypti*. *Med. Vet. Entomol.*, v. 2, n. 4, p. 319-24, 1988.
- MOGI, M.; CHOOCHOTE, W.; KHAMBOONRUANG, C. *et al.* Applicability of presence-absence and sequential sampling for ovitrap surveillance of *Aedes* (Diptera: Culicidae) in Chiang Mai, Northern Thailand. *J. Med. Entomol.*, v. 27, n. 4, p. 509-14, 1990.
- NATAL, D. *Manejo integrado de mosquitos*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000, 47 p.
- NEVES, D. P. *Parasitologia dinâmica*. São Paulo: Atheneu, 2003. 474 p.
- NOGUEIRA, M. R. N.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SHATZMAYR, H. G. *et al.* Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, n.6, p. 297-304, 1999.
- NOGUEIRA, M. R. N.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B. *et al.* Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p. 925-26, 2001.
- OLIVEIRA, T. F. R. *Pesquisa biomédica: da procura, do achado e da escritura de tese e comunicações científicas*. São Paulo: Atheneu, 1995. 237 p.
- PENNA, M. L. F. Ecological study of Rio de Janeiro City DEN-3 epidemic, 2001-2002. *Dengue Bull.*, v. 28, p. 20-24, 2004.
- PESSANHA, J. E. M.; DI LORENZO, C.; COSTA, M. A. *et al.* Soroprevalência de dengue no Município de Belo Horizonte II – Resultados Preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, 5, 2002, Curitiba-PR.
- PROTOCOLO para atendimento aos pacientes com suspeita de dengue. Local: Prefeitura Municipal, Secretaria Municipal de Saúde. Belo Horizonte, [2005 ?] 7 p.
- RESUMO dos principais caracteres morfológicos diferenciais do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus*. Brasília: (SUCAM) 1989. 19 f.

RESUMO Informativo do Aeroporto: *Aeroporto de Belo Horizonte / Pampulha*. Disponível em: <www.transportes.gov.br/bit/aeroportos/gaerplu.html> acesso em 03 fev 2006.

ROCCO, I. M.; BARBOSA, M. L.; KANOMATA, E. H. N. Simultaneous infection with Dengue 1 and Dengue 2 in a brazilian patient. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 40 n. 3, p. 151-54, 1998.

ROSEN, L.; GUBLER, D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.23, p.1153 - 60, 1974.

ROSEN, L.; SHROYER, D. A.; TESH, R. B. *et al.* Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32, p. 1108-09, 1983.

SANTOS, S.R.A.; MELO-SANTOS, M. A. V.; REGIS, L. *et al.* Field evaluation of ovitraps consociated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to determine oviposition rates of *Aedes aegypti*. *Dengue Bull.*, v. 27, p.156-62, 2003. Disponível em: < <http://www.scielo.php> > Acesso em: 15 fev. 2006.

SCANDAR, S. A. S.; CARDOSO JR., R. P.; GOLDENBERG, P. *et al.* Inquérito sorológico após epidemia de dengue. Paraíso - São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 62, n. 2, p. 83-89, 2003.

SHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, Suppl. 1 p. 179-181, 2000.

SHEPHERD, S.; HINFEY, P. Dengue fever. *Instante Access to the Minds of Medicine*. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/méd/trpic528.htm>> Acesso em: 09 jan. 2006.

TEIXEIRA M. G.; BARRETO, M. L.; COSTA, M. C. N. *et al.* Dynamics of dengue virus circulation: A silent epidemic in a complex urban area. *Trop. Med. Int.Health*, v. 7, n. 9, p. 757-62, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, M. L.; MOTA, E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: What research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad. Saúde Pública*, v. 21, n. 2, p. 1307-15, 2005.

WU, S. L.; LEE, E. M.; PUTVATANA, R. *et al.* Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 8, p. 2794-98, 2001.

ZAHIRI, N. *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) *oviposition attraction / repellency*.1997. 165f. Thesis (doctor of philosophy) Department of Natural Resource Ciencias, McGill University, Montreal. Disponível em: <www.collectionscanada.ca/obj/s4/f2/dsk1/tape11/PQDD_0019/NQ4464_0.pdf> Acesso em: 03 fev. 2006.