

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Xenomonitoramento de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para o Dengue
virus em Belo Horizonte, uma cidade de alto risco para a incidência de epidemias.

por

Juliana Maria Trindade Bezerra

Belo Horizonte
2016

JULIANA MARIA TRINDADE BEZERRA

Xenomonitoramento de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para o Dengue virus em Belo Horizonte, uma cidade de alto risco para a incidência de epidemias.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências – área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Coorientação: Dra. Nágila Francinete Costa Secundino

Belo Horizonte

2016

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

B574x
2016

Bezerra, Juliana Maria Trindade.

Xenomonitoramento de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para o Dengue virus em Belo Horizonte, uma cidade de alto risco para a incidência de epidemias / Juliana Maria Trindade Bezerra. – Belo Horizonte, 2016.

XXIII, 121 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 105 - 119

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Dengue/prevenção & controle 2. Vírus da Dengue/patogenicidade 3. *Aedes*/parasitologia I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientação). III. Secundino, Nágila Francinete Costa (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

JULIANA MARIA TRINDADE BEZERRA

Xenomonitoramento de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para o Dengue virus em Belo Horizonte, uma cidade de alto risco para a incidência de epidemias.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências – área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (FMT) Titular

Prof. Dra. Alzira Batista Cecílio (FUNED) Titular

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Grasielle Caldas D'Ávila (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Nilton Barnabé Rodrigues (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 03/06/2016.

“ Já costumo ser carvão, que de tão provado pelo fogo, vai virando pó; um dia fora rígido... Mas das cinzas se pode ressurgir? Sim, quando se cai e se levanta... Que sejamos como crianças dando os primeiros passos, quando a queda é inevitável e impulsivamente elas se levantam alegres porque de alguma forma conseguem entender que os desafios foram feitos para serem enfrentados... É sabido que depois da queda, a levantada vem mais segura, porque já se aprendeu o que levou à queda anterior... A dor nem sempre pode ser evitada, mas sim se pode tirar um benefício por menor que seja, dela. A dor ensina a saber suportar a mesma dor, ou nos prepara para aguentarmos as próximas que virão e não serão poucas... A luta diária continua e graças a Deus. Sem Ele, sem os desafios, sem a força que nos move a viver, nada seria possível.
Absolutamente nada".

Juliana Maria Trindade Bezerra

Dedico

Aos meus pais, José e Lucimar, meus maiores incentivadores, aqueles que com suas simples e verdadeiras palavras me ergueram e disseram que eu seria e sou capaz.

Ofereço

Ao meu querido esposo Carlos Alberto, por estar ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Suporte financeiro

Centro de Pesquisas René Rachou /Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ) – Bolsista de Doutorado

CAPES – Bolsa de Doutorado Sanduíche – Processo 99999.002206/2014-05

CNPq

FAPEMIG

PRONEX

Fundação Bill e Melinda Gates

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa só se concretizou, graças ao apoio relevante de todos os que aqui estão listados, além do apoio das agências de fomento já citadas.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta, pela oportunidade, ao me confiar tamanhas responsabilidades à frente deste projeto desafiador, pela confiança, pelos anos de convivência, pelos grandes ensinamentos.

A minha coorientadora Dra. Nágila Francinete Costa Secundino, que trabalhou diretamente comigo, e cuja participação na coordenação e execução das etapas deste projeto foi imprescindível, pelo apoio e suporte em muitos momentos deste trabalho.

À Fundação Bill e Melinda Gates pelo financiamento, acompanhamento e suporte para a realização desta pesquisa.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, aos professores do CPqRR pelo suporte durante minha formação nesses quatro anos, e em especial, aos pesquisadores membros do colegiado, e ao Dr. Edelberto Santos Dias pelo apoio pessoal e profissional em muitos momentos, por muitas vezes ter sido um grande incentivador diante de dificuldades que encontrei pelo caminho.

Ao pesquisador Dr. Breno de Mello Silva que colaborou em muitos momentos desse trabalho, no que concerne à padronização de técnicas moleculares adotadas no presente estudo.

À Dra. Helena Rocha Corrêa de Araújo, que além de ter atuado na padronização de técnicas apresentadas no estudo, foi e é uma grande amiga, de todos os momentos e de todas as ocasiões, cujo exemplo de pessoa e profissional me inspira.

Ao Dr. Jorge Arias (in memoriam) do Fairfax County Health Department, Estados Unidos, pelo suporte e acompanhamento dado para que este estudo se concretizasse.

Ao Dr. José Eduardo Marques Pessanha (in memoriam) pelo acompanhamento, orientações e conversas durante a realização desse estudo. Certamente o meio científico perdeu um grande ser humano e um exímio pesquisador.

À Secretaria Municipal de Saúde, aos gerentes dos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, e aos agentes de Controle de Endemias, com os quais tive a oportunidade de conviver ao longo destes anos, e que nos ajudaram no trabalho de campo e em muitos outros momentos desse trabalho.

Aos proprietários e responsáveis pelos imóveis nos Distritos Sanitários visitados, que nos receberam gentilmente e colaboraram para a instalação das armadilhas de captura de mosquitos.

A todos os técnicos, estudantes de Iniciação Científica e motoristas do Laboratório de Entomologia Médica que incansavelmente desempenharam seu papel, no trabalho de campo e no laboratório e se tornaram grandes amigos nesses quatro anos.

À Dra Maíra Aguiar e ao Dr. Nico Stollenwerk, do Centro de Matemática e Aplicações Fundamentais da Universidade de Lisboa, e em especial, aos colegas M. Sc. Luis Filipe e M. Sc. Luis Mateus, pelos ensinamentos matemáticos durante minha estada em Lisboa, Portugal.

À Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro, minha eterna mestra, orientadora e grande incentivadora, que sempre terá o meu agradecimento, pela profissional e pessoa maravilhosa que é.

À Dra. Luciana Diniz Silva pela realização das análises estatísticas do presente estudo. Agradeço os grandes ensinamentos estatísticos, a orientação em muitos momentos, por ter revisado minha tese com muita atenção e cuidado, pelas palavras de incentivo, pela amizade e consideração, pelas risadas e momentos de descontração e por ser um exemplo para mim.

Ao Dr. Fabrício Freire de Melo pelo apoio em muitos momentos deste trabalho.

À Dra. Giselle de Almeida Oliveira pelas conversas, apoio, conselhos, ensinamentos científicos e por corrigir com atenção minha tese.

Aos membros da banca de qualificação e defesa de tese pela atenção dada ao presente trabalho, pelas sugestões e críticas que muito contribuíram e contribuirão para a melhoria do mesmo.

À amiga Grace pelo companheirismo ao longo desses anos e pelo exemplo de força e superação.

À amiga Dayane pela força em todos os momentos de fraqueza.

Às amigas Marli, Inês, Catarina e a todas as colegas pelos meses de convívio em Lisboa, Portugal.

A todos os meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica, pelo apoio incondicional nesse período de muito aprendizado, em especial à Caroline Macêdo Gonçalves e seus familiares, com quem dividi moradia por dois anos. Obrigada pelos risos, lágrimas, almoços, conversas... Essa convivência fez valer a pena cada minuto de esforço e dedicação.

Ao meu esposo Carlos Alberto, por todo o apoio, principalmente nos instantes mais dolorosos, nas “ quedas” , e por ter sido sempre meu alicerce para que eu levantasse e tentasse outra vez.

A minha segunda família pela acolhida sincera, em especial a minha amiga, sogra e segunda mãe Maria Célia, pela amizade e por ter esse coração imenso, sempre me dando uma palavra especial ao longo desses anos.

Aos meus pais José e Lucimar que assim como eu, mergulharam de cabeça nesse desafio, mais uma vez, movidos pela certeza de que mais um degrau de minha formação profissional seria atingido. Agradeço o entendimento, o amor, a educação, os exemplos, a serenidade e a sabedoria com que me conduziram desde os meus primeiros passos até o presente momento. Sem o apoio desses dois queridos eu não teria conseguido.

Acima de tudo e de todos, agradeço a Deus pelo dom da vida, por me guiar, dar forças, ser o meu alicerce, a minha fortaleza e iluminar sempre.

RESUMO

Dengue é considerada a mais relevante arbovirose que afeta seres humanos, e constitui grave problema de saúde pública. A detecção de Dengue virus (DENV) por RT-PCR em Tempo Real, em mosquitos vetores do gênero *Aedes*, tem se mostrado importante ferramenta na vigilância epidemiológica. A presente pesquisa verificou a presença de DENV em mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* nos Distritos Sanitários (DS) Pampulha, Norte e Leste, de Belo Horizonte, Minas Gerais. Foram utilizadas armadilhas BG-Sentinel Full Version®, em capturas semanais de mosquitos, realizadas em quatro períodos: primeiro (dezembro de 2010 a maio de 2011), segundo (outubro de 2011 a maio de 2012), terceiro (outubro de 2012 a maio de 2013) e quarto (outubro de 2013 a maio de 2014). Foi instalado um total de 60 armadilhas (20 por DS). Após a identificação, as fêmeas de *Ae. aegypti* foram separadas em pools formados por um até 10 exemplares, e as fêmeas de *Ae. albopictus* foram separadas de forma individual. Procedeu-se com extração de RNA viral e RT-PCR em Tempo Real para a pesquisa de DENV. Foram coletadas 10.662 fêmeas de *Ae. aegypti* sendo 1.504 (14,10%), 2.516 (23,59%), 3.728 (34,98%) e 2.914 (27,33%) no primeiro, segundo, terceiro e quarto períodos respectivamente. Estas fêmeas foram agrupadas em 6.056 pools, dos quais 343 (5,66%) foram positivos para o DENV. Em relação ao *Ae. albopictus* foram coletadas 511 fêmeas, sendo 117 (22,89%), 44 (8,61%), 199 (38,96%) e 151 (29,54%) no primeiro, segundo, terceiro e quarto períodos respectivamente. Destas, 79 (15,45%) foram positivas para o vírus. Houve elevada ocorrência de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* nas áreas pesquisadas, positivas para o DENV. Isso mostra a importância da adoção de medidas de controle no sentido de reduzir as notificações da infecção em seres humanos.

Palavras-chave: Dengue virus, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, monitoramento.

ABSTRACT

Dengue is considered the most important arboviral disease that affects humans, and is a severe public health problem. Detection of Dengue virus (DENV) by RT-PCR Real Time in mosquitoes of the genus *Aedes*, has been an important tool in epidemiological surveillance. This research found the presence of DENV in female mosquitoes of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in Sanitary Districts (SD) Pampulha, North and East, of Belo Horizonte, Minas Gerais. BG-Sentinel Full Version® traps were used in weekly catch mosquitoes, carried out in four periods: first (December 2010 to May 2011), second (October 2011 to May 2012), third (October 2012 to May 2013) and fourth (October 2013 to May 2014). A total of 60 traps (20 per SD) were installed. After identification, *Ae. aegypti* were separated in pools formed by one to 10 specimens, and *Ae. albopictus* were separated individually. After viral RNA extraction we performed RT-PCR in Real Time to test for DENV. We collected 10,662 *Ae. aegypti* females been 1,504 (14.10%), 2,516 (23.59%), 3,728 (34.98%) and 2,914 (27.33%) in the first, second, third and fourth periods respectively. These females were grouped into 6,056 pools of which 343 (5.66%) were DENV positive. Regarding *Ae. albopictus* we collected 511 females been 117 (22.89%), 44 (8.61%), 199 (38.96%) and 151 (29.54%) in the first, second, third and fourth periods respectively. Of those, 79 (15.45%) were DENV positive. There was high occurrence of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in the surveyed areas, positive for DENV. This shows the importance of the adoption of control measures to reduce the cases of infection in humans.

Keywords: Dengue virus, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa da dengue, em 2016.....	26
Figura 2 –	Esquema ilustrativo da estrutura do Dengue virus.....	30
Figura 3 –	Desenho ilustrativo de uma fêmea de <i>Ae. aegypti</i>	33
Figura 4 –	Ciclo de vida de mosquitos do gênero <i>Aedes</i>	34
Figura 5 –	Desenho ilustrativo de uma fêmea de <i>Ae. albopictus</i>	35
Figura 6 –	Mapa dos Distritos Sanitários e áreas de abrangência das unidades básicas de saúde do município de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	41
Figura 7 –	Armadilha BG-Sentinel Full Version [®] desmontada e seus respectivos componentes.....	42
Figura 8 –	Armadilha BG-Sentinel Full Version [®] em funcionamento.....	43
Figura 9 –	Mapa do município Belo Horizonte, evidenciando os locais de instalação das armadilhas nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> coletadas em todo o estudo.....	51
Gráfico 2 –	Comparação entre medianas referentes às fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> coletadas em todo o estudo.....	52
Gráfico 3 –	Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no primeiro período, nos Distritos Sanitários em estudo.....	53
Gráfico 4 –	Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no segundo período, nos Distritos Sanitários em estudo.....	54
Gráfico 5 –	Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no terceiro período, nos Distritos Sanitários em estudo.....	55
Gráfico 6 –	Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no quarto período, nos Distritos Sanitários em estudo.....	56
Gráfico 7 –	Número de pools de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> totais e número de pools infectados pelo Dengue virus por semana, no primeiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	58
Gráfico 8 –	Número de pools de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> totais e número de pools infectados pelo Dengue virus por semana, no segundo período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	59
Gráfico 9 –	Número de pools de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> totais e número de pools infectados pelo Dengue virus por semana, no terceiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	60
Gráfico 10 –	Número de pools de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> totais e número de pools infectados pelo Dengue virus por semana, no quarto período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	61
Gráfico 11 –	Número de pools infectados de <i>Ae. aegypti</i> pelo Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no primeiro período.....	64
Gráfico 12 –	Número de pools infectados de <i>Ae. aegypti</i> pelo Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no segundo período.....	65

Gráfico 13 –	Número de pools infectados de <i>Ae. aegypti</i> pelo Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no terceiro período.....	66
Gráfico 14 –	Número de pools infectados de <i>Ae. aegypti</i> pelo Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no quarto período.....	67
Gráfico 15 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas em todo o estudo.....	68
Gráfico 16 –	Comparação entre medianas referentes às fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas em todo o estudo.....	69
Gráfico 17 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no primeiro período, nos Distritos Sanitários em estudo.....	70
Gráfico 18 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no segundo período, nos Distritos Sanitários em estudo.....	71
Gráfico 19 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no terceiro período, nos DS em estudo.....	72
Gráfico 20 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e índice pluviométrico semanal, no quarto período, nos Distritos Sanitários em estudo.....	73
Gráfico 21 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus por semana, no primeiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	75
Gráfico 22 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus por semana, no segundo período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	76
Gráfico 23 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus por semana, no terceiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	77
Gráfico 24 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus por semana, no quarto período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	78
Gráfico 25 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no primeiro período.....	80

Gráfico 26 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no segundo período.....	81
Gráfico 27 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no terceiro período.....	82
Gráfico 28 –	Número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no quarto período.....	83
Gráfico 29 –	Correlação entre número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos quatro períodos de estudo.....	84
Gráfico 30 –	Correlação entre número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos quatro períodos de estudo, no Distrito Sanitário Pampulha.....	85
Gráfico 31 –	Correlação entre número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos quatro períodos de estudo, no Distrito Sanitário Norte.....	85
Gráfico 32 –	Correlação entre número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos quatro períodos de estudo, no Distrito Sanitário Leste.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização dos períodos de coleta de culicídeos, com destaque aos anos, meses e semanas de captura.....	44
Tabela 2 –	Cronograma das coletas de mosquitos em Distritos Sanitários de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	46
Tabela 3 –	Componentes do kit Power SYBR [®] Green RNA-to-C _T [™] 1-Step.....	47
Tabela 4 –	Mix da reação de RT-PCR em Tempo Real.....	48
Tabela 5 –	Programação da máquina de RT-PCR em Tempo Real.....	48
Tabela 6 –	Correlação entre número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> coletadas e variáveis meteorológicas, nos quatro períodos de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	57
Tabela 7 –	Número e porcentagem de pools de <i>Ae. aegypti</i> positivos para o Dengue virus, nos quatro períodos de coleta e nos três Distritos Sanitários em estudo.....	62
Tabela 8 –	Número e porcentagem de casos de dengue, por período de coleta, registrados nos três Distritos Sanitários em estudo.....	63
Tabela 9 –	Correlação entre número de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> coletadas e variáveis meteorológicas, nos quatro períodos de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.....	74
Tabela 10 –	Número e porcentagem de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> positivas para o Dengue virus, nos quatro períodos de coleta e nos três Distritos Sanitários em estudo.....	79

LISTA DE SIGLASE ABREVIATURAS

%: por cento

<: menor que

≤: menor ou igual a

=: igual a

Å: angstrom

': minuto

": segundo

°C: graus Celsius

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ABRASCO: Associação Brasileira de Saúde Coletiva

C: Proteína estrutural do capsídeo da partícula viral

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC: Centers of Disease Control

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar, do inglês complementary deoxyribonucleic acid

CHIKV: vírus da Chikungunya

cm: centímetro

cm³: centímetro cúbico

CNPQ: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COPASA: Companhia de Saneamento de Minas Gerais

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

C_T: ciclo de threshold

d. C.: depois de Cristo

DC: Dengue Clássica

DCC: Dengue com Complicações

DENV: vírus da dengue (ou Dengue virus)

DENV-1: Dengue virus 1

DENV-2: Dengue virus 2

DENV-3: Dengue virus 3

DENV-4: Dengue virus 4

DNA: ácido desoxirribonucléico do inglês deoxyribonucleic acid

DS: Distrito Sanitário

E: Proteína estrutural do envelope da partícula viral
EUA: Estados Unidos da América do inglês United States of America
FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FHD: Febre Hemorrágica da Dengue
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer (Transferência de Energia por Ressonância Fluorescente)
FUNASA: Fundação Nacional de Saúde
g: grama
g/cm³: grama por centímetro cúbico
H: estatística H referente ao Teste de Kruskal-Wallis
hab.: habitante
hab./Km²: habitantes por quilômetro quadrado
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFA: Immunofluorescence Antibody Assay (Ensaio de Anticorpos por Imunofluorescência)
IIP: Índice de Infestação Predial
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
Km²: quilômetro quadrado
LIRAa: Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *Aedes aegypti*
m: metro
m²: metro quadrado
M: Proteína estrutural da membrana da partícula viral
MG: Minas Gerais
mL: mililitro
mm: milímetro
mm³: milímetro cúbico
MS: Ministério da Saúde
nm: nanômetro
NS1: Non Structural protein 1 (Proteína não-estrutural NS1)
NS2A: Non Structural protein 2A (Proteína não-estrutural NS2A)
NS2B: Non Structural protein 2B (Proteína não-estrutural NS2B)
NS3: Non Structural protein 3 (Proteína não-estrutural NS3)
NS4A: Non Structural protein 4A (Proteína não-estrutural NS4A)
NS4B: Non Structural protein 4B (Proteína não-estrutural NS4B)

NS5: Non Structural protein 5 (Proteína não-estrutural NS5)

OMS: Organização Mundial de Saúde do inglês World Health Organization

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde do inglês Pan American Health Organization

p: valor de p

PBH: Prefeitura de Belo Horizonte

pmol: picomol

prM: Proteína precursora M

PRONEX: Programa de Apoio a Núcleos de Excelência

RE: Retículo Endoplasmático

RNA: ácido ribonucléico do inglês Ribonucleic Acid

RT-PCR: Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase do inglês Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR: Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa do inglês Reverse Transcriptase- Quantitative Polymerase Chain Reaction

rpm: rotações por minuto

r_s : valor da correlação de Spearman

SCD: Síndrome do Choque da Dengue

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMS: Secretaria Municipal de Saúde

SUS: Sistema Único de Saúde

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

T_m : temperatura de melting

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

μ L: microlitro

ZIKV: vírus da Zica (ou Zika virus)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Dengue: doença.....	24
1.1.1 Breve histórico.....	24
1.1.2 Descrição.....	24
1.1.3 Epidemiologia.....	26
1.1.3.1 Dengue nas Américas.....	26
1.1.3.2 Dengue no Brasil.....	27
1.1.3.3 Dengue na cidade de Belo Horizonte.....	28
1.2 Dengue virus.....	29
1.2.1 Morfologia.....	29
1.2.2 Dengue virus no hospedeiro vertebrado.....	30
1.2.3 Dengue virus no hospedeiro invertebrado.....	31
1.3 Vetores da dengue.....	32
1.3.1 <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	32
1.3.2 <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894).....	34
1.4 Xenomonitoramento de Dengue virus em mosquitos de campo.....	36
1.4.1 RT-PCR em Tempo Real na identificação de Dengue virus.....	37
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Área de Estudo.....	40
3.2 Armadilha para coleta dos culicídeos.....	42
3.3 Períodos de coleta.....	43
3.4 Coleta dos culicídeos.....	44
3.5 Identificação dos culicídeos.....	46
3.6 Extração de RNA viral.....	47
3.7 RT-PCR em Tempo Real.....	47
3.8 Construção da curva padrão.....	49
3.9 Critério de positividade e negatividade para a pesquisa de RNA de Dengue virus nas amostras de campo.....	49
3.10 Dados meteorológicos.....	49

3.11 Casos de Dengue.....	49
3.12 Análise estatística.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Aedes aegypti.....	51
4.1.1 Captura de culicídeos.....	51
4.1.1.1 Primeiro período de coleta.....	53
4.1.1.2 Segundo período de coleta.....	53
4.1.1.3 Terceiro período de coleta.....	54
4.1.1.4 Quarto período de coleta.....	55
4.1.2 Correlação entre número de fêmeas de Aedes aegypti e fatores climáticos considerando todo o período de estudo.....	57
4.1.3 Amostras positivas para o Dengue virus por períodos e semanas.....	58
4.1.3.1 Primeiro período de coleta.....	58
4.1.3.2 Segundo período de coleta.....	58
4.1.3.3 Terceiro período de coleta.....	59
4.1.3.4 Quarto período de coleta.....	60
4.1.3.5 Distritos Sanitários.....	61
4.1.4 Amostras positivas para o Dengue virus e ocorrência de casos de dengue nos Distritos Sanitários.....	63
4.1.4.1 Primeiro período de coleta.....	63
4.1.4.2 Segundo período de coleta.....	64
4.1.4.3 Terceiro período de coleta.....	65
4.1.4.4 Quarto período de coleta.....	66
4.2 Aedes albopictus.....	68
4.2.1 Captura de culicídeos.....	68
4.2.1.1 Primeiro período de coleta.....	70
4.2.1.2 Segundo período de coleta.....	70
4.2.1.3 Terceiro período de coleta.....	71
4.2.1.4 Quarto período de coleta.....	72
4.2.2 Correlação entre número de fêmeas de Aedes albopictus e fatores climáticos considerando todo o período de estudo.....	74
4.2.3 Amostras positivas para o Dengue virus por períodos e semanas.....	75
4.2.3.1 Primeiro período de coleta.....	75

4.2.3.2 Segundo período de coleta.....	75
4.2.3.3 Terceiro período de coleta.....	76
4.2.3.4 Quarto período de coleta.....	77
4.2.3.5 Distritos Sanitários.....	78
4.2.4 Amostras positivas para o Dengue virus e ocorrência de casos de dengue nos Distritos Sanitários.....	80
4.2.4.1 Primeiro período de coleta.....	80
4.2.4.2 Segundo período de coleta.....	80
4.2.4.3 Terceiro período de coleta.....	81
4.2.4.4 Quarto período de coleta.....	82
4.3 Correlação entre número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	84
5 DISCUSSÃO.....	87
5.1 Captura de culicídeos por períodos e semanas, Distritos Sanitários e fatores climáticos.....	87
5.2 Amostras positivas para o Dengue virus por períodos e semanas.....	95
5.3 Amostras positivas para o Dengue virus em culicídeos e ocorrência de casos de dengue nos Distritos Sanitários.....	100
5.4 Considerações finais.....	102
6 CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICES.....	120
Apêndice 1. Modelo de termo de autorização assinado pelo morador ou responsável pelo imóvel para a realização da pesquisa de campo.....	121
Apêndice 2. Artigo submetido à publicação.....	122
ANEXO.....	140
Anexo 1. Dados complementares ao artigo científico apresentado na Tese de Doutorado.....	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue: doença

1.1.1 Breve histórico

Relatos iniciais sobre uma doença provavelmente causada pelo Dengue virus (DENV) são encontrados em enciclopédias chinesas das dinastias Chin (265 a 420 d. C.), Tang (610 d. C.) e Northern Sung (992 d. C.) (NOBUCHI, 1979). Esse agente etiológico também pode ter sido responsável por surtos de doença febril ocorridos no século XVII em ilhas a oeste do Oceano Pacífico e no Panamá. Adicionalmente, em Jacarta, Indonésia e Egito, no século XVIII, várias epidemias foram associadas à presença do DENV (CAREY, 1971; HOWE, 1977; MCSHERRY, 1982). No entanto, a primeira descrição detalhada da doença foi feita somente em 1780, na Filadélfia, Estados Unidos da América (EUA). No século XIX, várias epidemias dessa enfermidade foram registradas em Zanzibar, Calcutá, Grécia e Japão (FIGUEIREDO; FONSECA, 2005). Na primeira metade do século XX, observou-se que as mudanças ambientais associadas ao intenso deslocamento de seres humanos, ao acelerado crescimento populacional e à urbanização descontrolada no período pós-guerra, contribuíram para o aumento de casos de dengue no mundo (GUBLER et al, 1978; GUBLER et al, 1981; GUBLER, 1988).

Hammon et al. (1960) descreveram pela primeira vez nas Filipinas, a forma grave da doença caracterizada por hemorragia grave e/ou choque que provocava óbito em 40% dos enfermos: era a chamada Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)/Síndrome do Choque da Dengue (SCD). Já a partir da década de 1970, as epidemias de dengue se agravaram, em especial nos países tropicais e subtropicais, representando um problema de saúde pública mundial. Nas Américas, a primeira epidemia de dengue foi registrada em 1981 em Cuba, totalizando 344.203 casos notificados, dos quais 10.312 corresponderam à forma grave da doença, com o registro de 158 óbitos (MARTÍNEZ, 2006).

1.1.2 Descrição

A dengue é considerada a doença de transmissão vetorial com o maior crescimento no mundo. Estimam-se 390 milhões de infecções anuais, 96 milhões de casos correspondentes às formas graves da doença e 22.000 mortes, principalmente em crianças (WHO, 2016). Trata-se de uma doença aguda, infecciosa, não contagiosa, sistêmica e de etiologia viral, causada por quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4)

pertencentes ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. O vírus é transmitido pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, sendo o *Ae. aegypti* o vetor primário, o qual se encontra distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, predominantemente em áreas urbanas e semiurbanas. Esse vetor está presente em mais de 100 países nas diferentes regiões do mundo: Sudeste Asiático, Américas (Sul, Central e Norte), África, Pacífico e Mediterrâneo (WHO, 2006; WHO, 2007). Na Europa, foi registrado um surto de dengue na Ilha da Madeira, Portugal, em outubro de 2012, quando na ocasião foram notificados 2.168 casos da doença, sem a ocorrência de óbitos. Também foram reportados 70 casos de dengue em outros 13 países europeus, todos em viajantes regressados daquela Ilha (DGS/PT, 2013).

Devido a epidemias de proporções gigantescas, rápida propagação viral e a gravidade considerável dos casos de dengue grave (relatados anteriormente como casos de FHD/SCD), a doença tem impacto vultoso na saúde e economia, especialmente em países em desenvolvimento. A infecção pelo vírus da dengue possui um amplo espectro clínico-patológico, que varia de quadros assintomáticos até quadros sintomáticos como na dengue com sinais de alarme e dengue grave, ambos com maior gravidade e que podem evoluir para óbito. Indivíduos infectados com um determinado sorotipo viral adquirem imunidade duradoura específica para o mesmo tipo viral infectante, mas não para os outros três tipos. Pessoas que moram em áreas endêmicas da dengue podem apresentar várias infecções por sorotipos diferentes no decorrer da vida. Observações epidemiológicas sugerem que infecções sucessivas por diferentes sorotipos aumentam o risco de desenvolver dengue grave (HALSTEAD, 1997; HALSTEAD, 2007).

Não é possível saber se o indivíduo ao se infectar, desenvolverá as formas mais leves da doença ou evoluirá para a dengue grave, pois a patogênese desta última ainda não está totalmente esclarecida. Contudo, tem sido observado que o risco de dengue grave é cerca de quinze vezes maior na infecção secundária que na primária. Dentre os fatores associados à ocorrência de casos graves, destacam-se altas taxas de infestação pelo *Ae. aegypti*, elevadas densidades populacionais humanas em uma determinada região, circulação concomitante de mais de um sorotipo do DENV e intenso deslocamento geográfico de pessoas para áreas de alta endemicidade. Em relação ao homem, idade, susceptibilidade genética e infecção prévia podem ser considerados fatores que aumentam as chances de complicações (HALSTEAD, 1988; GUBLER, 1997; GUBLER, 1998; GUBLER, 2002).

Em janeiro de 2014, o Brasil passou a adotar a nova classificação dos casos de dengue revisada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2009. Até o ano de 2013, a dengue era classificada no país em dengue clássica (DC), FHD e SCD (MS, 2011). No

entanto, a denominação dengue com complicações (DCC) era uma classificação intermediária adotada apenas no Brasil, o que segundo a OMS, resultava em uma falta na padronização de casos entre os países. Na nova classificação as formas clínicas dengue ou dengue sem sinais de alarme (caracterizada por febre alta, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, surgimento de petéquias entre outros sintomas), dengue com sinais de alarme (caracterizada pelo agravamento da forma anterior, com a ocorrência de fenômeno hemorrágico, principalmente pelas mucosas) e dengue grave (forma mais grave, no qual o indivíduo acometido entra em estado de choque e pode evoluir para óbito) passaram a ser adotadas (OMS, 2009; SINAN, 2014).

1.1.3 Epidemiologia

1.1.3.1 Dengue nas Américas

A dengue está presente nas Américas há alguns séculos, no entanto, a situação atual é bastante dinâmica e tem piorado nas últimas décadas (Figura 1). O primeiro relato da doença como surto ocorreu em 1780, na Filadélfia. No século XIX quatro grandes epidemias foram registradas nos países do Caribe e no sul dos EUA (OPAS, 2007).

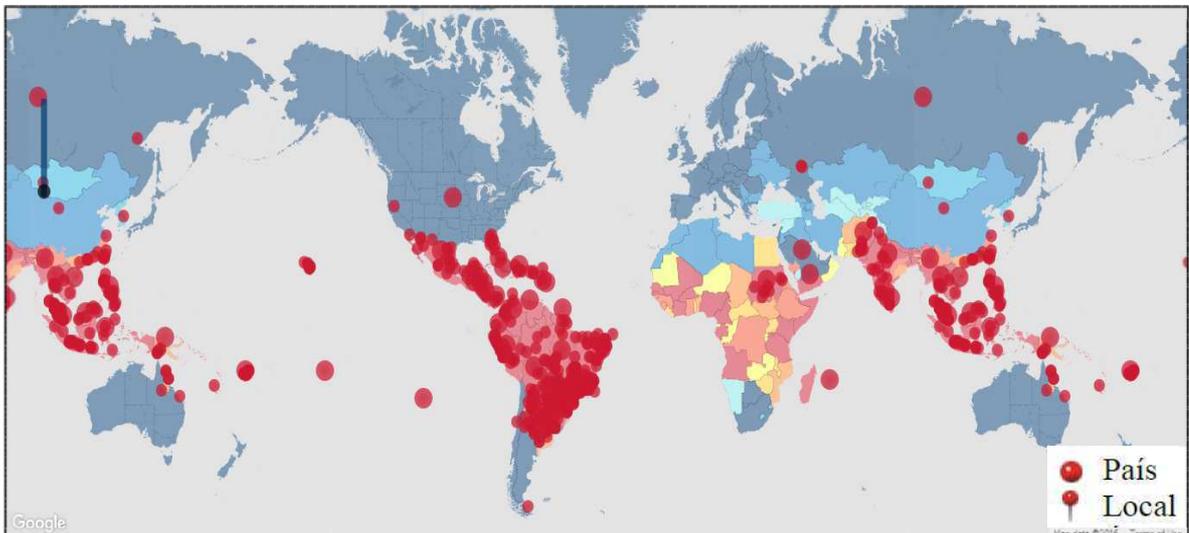


FIGURA 1: Mapa da dengue, em 2016. As regiões com pontos vermelhos destacados indicam áreas de risco para a doença em 2016, definidas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), conforme relatos obtidos pelos Ministérios da Saúde, organizações de saúde internacionais, revistas e especialistas.

Fonte: Adaptado do CDC – Health Map Colaboration, 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/Dengue/>

O primeiro isolamento de DENV nas Américas ocorreu em 1953, na Ilha de Trinidad, no Caribe, onde o DENV-2 foi identificado (RACE et al., 1979). Dez anos mais tarde, o DENV-3 foi identificado e isolado em epidemia no mesmo país e na Venezuela. Em

1968, cinco países registraram casos, e em 1981 a doença já estava presente em 28 países do continente americano (WILSON; CHEN, 2002).

Na década de 1970, epidemias ocasionadas por DENV-2 e DENV-3 ocorreram em países da América Central e da América do Sul. O DENV-1, por sua vez, fora introduzido nas Américas, em 1977 na Jamaica. A circulação do novo sorotipo foi responsável por uma devastadora epidemia que se prolongou até 1980, atingindo ilhas caribenhas, Honduras, Guatemala, Belize, Venezuela, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, México e o Estado do Texas, nos EUA. No ano de 1981, o DENV-4 também ocasionou vários surtos no Caribe, no norte da América do Sul, América Central e México (WILSON; CHEN, 2002).

1.1.3.2 Dengue no Brasil

A primeira epidemia de dengue documentada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu nos anos de 1981 e 1982, em Boa Vista, Estado de Roraima, e foi causada pelos sorotipos 1 e 4. O DENV-1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e o Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco e Bahia) em 1986 e 1987, espalhando-se pelo país. Em seguida, ocorreram as entradas dos sorotipos DENV-2 em 1990 e 1991, DENV-3 em 2001 e 2002 e DENV-4 em 2010 e 2011 (MS, 2013). A partir de 1998, houve um aumento na mortalidade por dengue com sinais de alarme e dengue grave, quando se verificou uma grande expansão territorial da circulação viral. Neste mesmo ano, no Nordeste foi observada uma elevada incidência (564,1 casos por 100 mil habitantes) e um maior número de notificações (258.441). Os sorotipos DENV-1 e DENV-2, até ao final do período de 1994-1998, circulavam em 49% dos 5.570 municípios do país e o vetor foi detectado em mais de 50% (2.910). Até então, não haviam sido relatados casos autóctones na região Sul, onde o fator climático poderia ter dificultado a proliferação do vetor. No entanto, em 1999, a dengue se espalhou para outras áreas do país, especialmente pela região Norte, que apresentou a maior taxa de incidência nos anos subsequentes, com 408,1 casos por 100.000 habitantes em 2001 (TEIXEIRA et al., 2005).

Destaca-se que nas últimas décadas, o país viveu quatro grandes epidemias, associadas à mudança do sorotipo viral predominante: DENV-1, DENV-3, DENV-2, e DENV-4, em 1998, 2002, 2008 e 2010, respectivamente (MS, 2010).

Nos anos que se seguiram, a dengue voltou a preocupar os órgãos de saúde pública. Em 2011, foram notificados 764.032 casos da doença no Brasil, e em 2012 este número foi reduzido para 591.384 notificações. Já em 2013, a situação novamente se agravou, tendo em vista que, registrou-se 1.452.489 casos da doença em todo o território nacional (MS, 2013).

No ano de 2014, apesar da redução considerável em relação ao ano anterior, as notificações da doença chegaram a 589.107 em todo o país, sendo que a região Sudeste foi a que apresentou um maior número de casos com 301.585 (55,1%) (MS, 2014a; MS, 2014b).

Em 2015 foram registrados 1.649.008 casos de dengue no país. A região Sudeste teve o maior número de casos notificados (1.026.226 casos; 62,20%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro-Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%) (MS, 2015). Nos meses de janeiro a abril de 2016, o Ministério da Saúde notificou até a semana epidemiológica 16, 1.054.127 casos prováveis de dengue em todo o país, com a confirmação de 340 casos de dengue grave e 3.626 casos de dengue com sinais de alarme (MS, 2016).

Atualmente, a dengue encontra-se presente em todos os 27 estados da federação, sendo responsável por cerca de 60% das notificações nas Américas. Além disso, os quatro sorotipos da dengue estão circulando no país, contribuindo para a incidência das formas graves da dengue nas cidades onde se registraram epidemias sequenciais por pelo menos dois sorotipos diferentes (MS, 2016).

1.1.3.3 Dengue na cidade de Belo Horizonte

Em 1996, o município de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais, registrou sua primeira epidemia de dengue, com 1.806 casos da doença na forma clássica, causada pelo DENV-1. Os primeiros casos foram confirmados no Distrito Sanitário (DS) de Venda Nova, correspondendo a 88% das notificações. No ano seguinte, entre os meses de fevereiro e outubro, constatou-se novamente a circulação de DENV-1, com o registro de 2.327 casos, sendo o DS Oeste, o predominante com a maioria dos casos, isto é, 56% (PBH, 2010).

Nos anos seguintes, a dengue alcançou maiores proporções no município. Em 1998, na terceira epidemia, verificou-se o registro de 86.791 casos de DC ocasionados por DENV-1 e DENV-2, confirmados principalmente por critério laboratorial. Naquele ano também foram registrados 27 casos de dengue grave e os três primeiros óbitos atribuídos à doença no município. A maioria das notificações ocorreu nos DS Leste, Nordeste, Noroeste e Venda Nova, que apresentaram incidências superiores à do município como um todo, que foi de 4,0859 por 100.000 habitantes, sendo 50 vezes superior à primeira epidemia e 40 vezes superior à segunda. Em 2002, foi observada a circulação do DENV-3, no entanto, não houve um grande número de registros (PBH, 2010).

De 1999 a 2005, observou-se baixa intensidade da endemia em Belo Horizonte. No entanto, em 2006 houve novo aumento na ocorrência de casos da doença. Pessanha et al. (2012) atribuíram o crescimento das notificações, à provável resistência do *Ae. aegypti* ao larvicida usado para seu controle. Em 2012, foram notificados 4.983 casos da doença no município (PBH, 2012a). No entanto em 2013, houve o registro de 95.496 casos, o que corresponde em 130 vezes o número de notificações do ano anterior (PBH, 2013). Em 2016, 61.604 casos da doença foram confirmados até o mês de maio (PBH, 2016).

1.2 Dengue vírus

1.2.1 Morfologia

O Dengue vírus é um dos mais significantes patógenos virais humanos transmitidos por mosquitos (WHO, 2014). Esse vírus pertence ao gênero *Flavivirus* (do latim *Flavus* que significa amarelo, por causa da icterícia induzida pelo vírus da febre amarela) que compreende um vasto grupo de vírus envelopados transmitidos por artrópodes e de grande importância médica, a exemplo do vírus da febre amarela, do West Nile, da encefalite transmitida por carrapatos, da encefalite japonesa e do vírus da Zika (ZIKV) (BURKE; MONATH, 2001; LINDENBACH; RICE, 2001; KUHN et al., 2002).

Micrografias eletrônicas mostram que este vírus apresenta uma superfície relativamente lisa, com um diâmetro de aproximadamente 500 Å e um núcleo denso rodeado por uma bicamada lipídica. Além do genoma de RNA senso-positivo de aproximadamente 10.700 nucleotídeos, há três proteínas na partícula: E do envelope (495 aminoácidos), M da membrana (75 aminoácidos) e C do capsídeo (100 aminoácidos) (RUSSELL et al., 1980).

A proteína E corresponde ao determinante antigênico principal de partículas virais e medeia a ligação e a fusão durante a entrada do vírus em células hospedeiras. A proteína M, produzida durante a maturação das partículas virais nascentes, é um pequeno fragmento proteolítico da proteína precursora prM. A principal função da prM é impedir que a proteína E sofra um rearranjo catalizado por ácido para a forma fusogênica durante o trânsito através da via secretora. O segmento “pr” na posição N-terminal contém de um a três sítios de glicosilação e seis resíduos conservados de cisteínas. Dessa forma, esta porção é clivada por uma protease celular furina, residente no compartimento de Golgi durante a exocitose do vírus, permitindo que a proteína M forme um dímero e fique ancorada no envelope viral, e o segmento “pr” seja liberado no meio extracelular (LINDENBACH et al., 2007).

A remoção do envelope lipídico com detergentes não iônicos, revela nucleocapsídeos discretos ($1,30-1,31 \text{ g/cm}^3$), que consistem na proteína C. Também fazem parte da organização do vírus sete proteínas não estruturais (NS) – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – envolvidas na replicação do RNA viral, montagem do vírus e modulação das respostas de células hospedeiras (Figura 2) (RUSSELL et al., 1980; LINDENBACH et al., 2007).

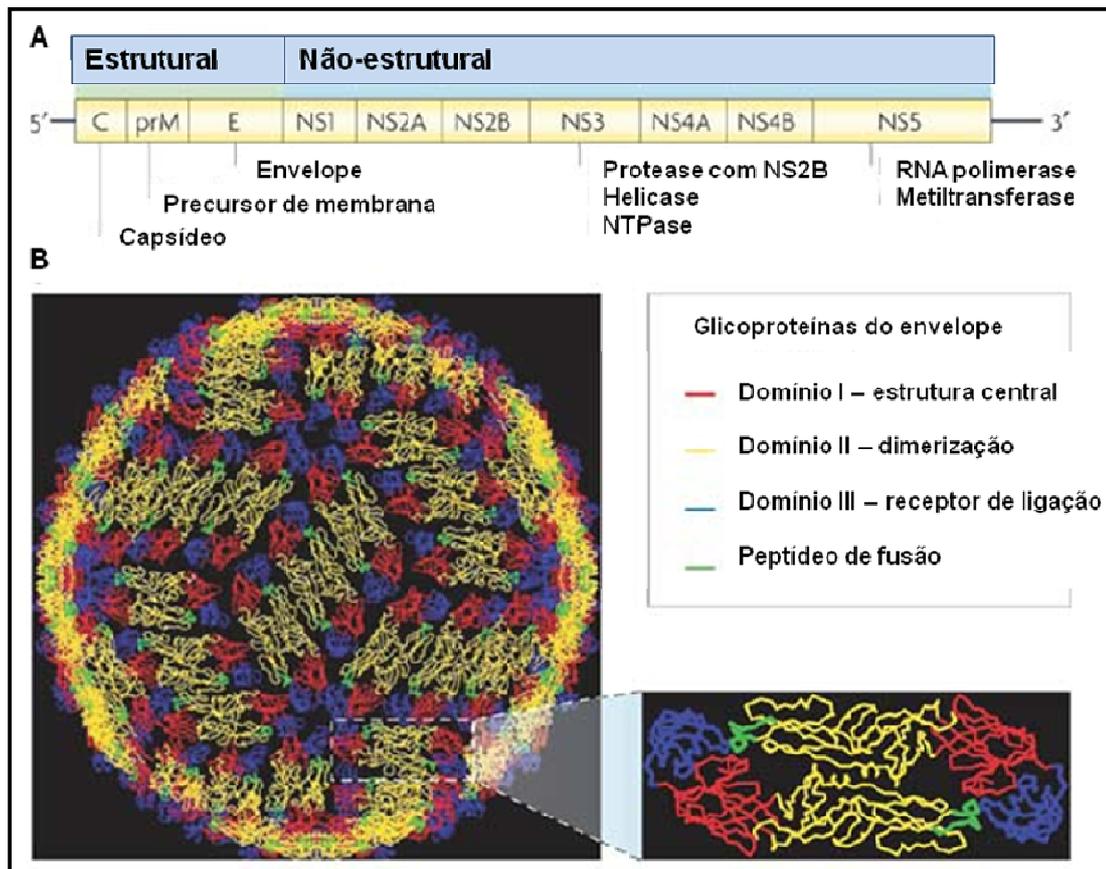


FIGURA 2: Esquema ilustrativo da estrutura do Dengue vírus. (A) O DENV contém um genoma RNA senso-positivo e compreende aproximadamente 10.700 nucleotídeos. Ambas as regiões 5' e 3' não traduzidas têm um papel chave na regulação da tradução e da síntese do genoma do RNA. A tradução do RNA viral produz um único polipeptídeo que é co-traducionalmente processado por proteases celulares e virais e gera três proteínas estruturais e, pelo menos, sete proteínas não estruturais. (B) O DENV é um vírus esférico com diâmetro de aproximadamente 50 nm.

Fonte: Adaptado de Whitehead et al. (2007).

1.2.2 Dengue vírus no hospedeiro vertebrado

Os flavivírus entram nas células hospedeiras (células estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais) por endocitose mediada por receptores de membrana. A acidificação da vesícula endossomal induz alterações conformacionais no vírion, o que permite a perda do

revestimento do nucleocapsídeo, e o genoma do vírion é libertado para o citoplasma. O RNA senso-positivo é traduzido em uma única poliproteína que é processada co- e pós-translacionalmente por proteases virais e do hospedeiro. A montagem do vírus ocorre na superfície do Retículo Endoplasmático (RE), quando as proteínas estruturais e segmentos de RNA recentemente sintetizados encontram-se no lúmen do RE. As partículas virais resultantes não-infecciosas e imaturas são transportadas através do complexo de Golgi. As partículas virais imaturas são clivadas por proteases do hospedeiro, resultando em partículas maduras e infecciosas. Víriões maduros e partículas subvirais são posteriormente liberados por exocitose (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

1.2.3 Dengue virus no hospedeiro invertebrado

O período de incubação extrínseca, que leva de sete a 10 dias (SALAZAR et al., 2007), vai desde o momento em que o mosquito se infecta, após o repasto sanguíneo em um indivíduo com a doença na fase aguda; o vírus se multiplica e migra para as glândulas salivares do inseto. Após ingestão de sangue contaminado com o DENV, as partículas virais se ligam a receptores específicos do intestino médio do mosquito para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, replicarem-se nas células epiteliais intestinais. A partir daí estas partículas estarão prontas para deixarem o intestino e seguirem para a hemocele, onde poderão infectar órgãos secundários como os ovários (possibilitando também a infecção transovariana) e o corpo gorduroso. O mosquito só estará apto a transmitir o vírus se este invadir e se estabelecer nas glândulas salivares. As partículas virais são injetadas em um novo hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante um novo repasto sanguíneo do inseto (HARDY et al., 1980; RICO-HESSÉ, 1990; WOODRING et al., 1996; SIM et al., 2012).

Assim como ocorre com outros arbovírus, a dinâmica de replicação do DENV em mosquitos infectados oralmente depende da temperatura na qual o mosquito é mantido, da cepa e quantidade de vírus ingerido e, possivelmente, do genótipo e da espécie do mosquito envolvida (RICO-HESSÉ, 1990; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

1.3 Vetores da dengue

1.3.1 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O mosquito *Ae. aegypti* pertence à ordem Diptera da família Culicidae. No Brasil, o *Ae. aegypti* tem sido responsável, recentemente, pela transmissão dos ZIKV e do vírus da Chikungunya (CHIKV), causando epidemias concomitantes com a de dengue (MS, 2016). O *Ae. aegypti* é um mosquito antropofílico, costuma picar durante o dia e tem preferência por sangue humano (Figura 3). O *Ae. aegypti* foi importado da África para a América durante a colonização e o tráfico de escravos, disseminou-se para toda a faixa tropical em vista de seu peculiar modo de reprodução e hoje é considerado cosmopolita. No Hemisfério Ocidental a espécie está inteiramente relacionada com a população humana. Depósitos artificiais utilizados em abundância pela sociedade moderna constituem os mais importantes criadouros, responsáveis pela produção e manutenção de grandes populações deste vetor (POWELL; TABACHNICK, 2013; KRAEMER et al., 2015).

Os ovos de *Ae. aegypti* têm cerca de um mm de comprimento e apresentam contorno alongado e fusiforme. O desenvolvimento embrionário se completa após 48 horas a contar da postura, em condições favoráveis de umidade e temperatura. Uma vez concluído o desenvolvimento do embrião, estes são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, o que é considerado um obstáculo para sua erradicação. Desta forma, também há possibilidade do mosquito se disseminar por amplas áreas geográficas. O estágio de larva, o segundo da vida do inseto, corresponde ao período de alimentação e crescimento. A larva apresenta cabeça, tórax e abdômen e consome principalmente material orgânico encontrado nos criadouros, durante seus quatro estádios evolutivos. As características de aversão à luminosidade, a tendência a afugentar-se ao mais leve movimento na água e seu modo de nadar, constituem pontos de utilidade para sua identificação. A duração desta fase é dependente de temperatura, disponibilidade de alimento e densidade de larvas no recipiente. Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação ser menor que cinco dias (POWELL; TABACHNICK, 2013; KRAEMER et al., 2015).

A espécie na fase de pupa não se alimenta. Nesta fase, permanece a maior parte do tempo inativa na superfície da água. Este estágio compreende geralmente de dois a três dias e se caracteriza pelo surgimento de caracteres do adulto, a exemplo de asas, probóscida e patas. O adulto representa a fase reprodutiva do vetor (Figura 3).



FIGURA 3: Desenho ilustrativo de uma fêmea de *Ae. aegypti*.

Fonte: Imagem disponível em: <http://www.araras.sp.gov.br/aedes/>.

O mosquito apresenta coloração escura, com escamas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto. Os machos se distinguem das fêmeas por possuírem antenas plumosas e palpos mais alongados, característica também presente em mosquitos *Ae. albopictus*. As fêmeas, por sua vez são as únicas a se alimentarem de sangue, de onde obtêm proteínas para a maturação dos ovócitos, tendo marcada predileção pelo homem, mas naturalmente podem ingerir seiva de plantas. Este comportamento antropofílico, associado ao encontro do mosquito no meio urbano, torna-se um desafio para o controle da dengue (BRAGA, 2007; COSTA et al., 2012; POWELL; TABACHNICK, 2013; KRAEMER et al., 2015). A Figura 4 apresenta os estádios de desenvolvimento de mosquitos do gênero *Aedes*.

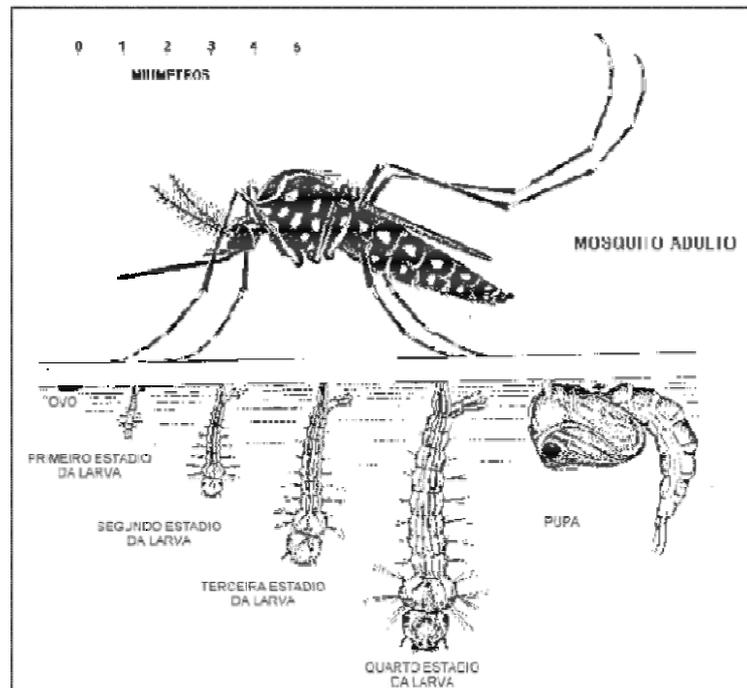


FIGURA 4: Ciclo de vida de mosquitos do gênero *Aedes*. O mosquito apresenta três fases aquáticas, ovo, larva (quatro estádios larvários) e pupa, antes de atingir à fase adulta.

Fonte: FUNASA, 2001. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf.

1.3.2 *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)

O mosquito *Ae. albopictus* pertence ao grupo *Scutellaris* do subgênero *Stegomyia*. É considerada vetor secundário do vírus da dengue, sobretudo no sudeste da Ásia (KNUDSEN, 1995) (Figura 5). O *Ae. albopictus* tem origem asiática, por isso recebe a denominação de “Tigre Asiático”. A sua distribuição original incluía o sudeste do continente Asiático, sendo considerado autóctone das regiões Oriental, Australásia (Austrália, Nova Zelândia e Nova Guiné), Oceania e Paleártica. No entanto, o comércio internacional de pneus usados tem facilitado a disseminação da espécie que atingiu localidades distantes de seu centro de origem, como os continentes Norte e Sul Americanos, África, Europa meridional, assim como algumas ilhas do Pacífico e Havá, ocupando principalmente os ambientes urbano e periurbano (HUGHES; PORTER, 1956).



FIGURA 5: Desenho ilustrativo de uma fêmea de *Ae. albopictus*.

Fonte: Imagem disponível em: <http://www.biologia.seed.pr.gov.br>.

Em semelhança ao *Ae. aegypti*, os ovos de *Ae. albopictus* embrionados são aptos a sobreviver por períodos prolongados em umidade e temperatura moderadas. Quanto à fase larvária, o desenvolvimento dos quatro estádios varia de cinco a dez dias em temperatura ambiente aproximada dos 25°C. A baixa oferta de alimento durante esta fase pode ocasionar decréscimo no tamanho do adulto, como verificado também em *Ae. aegypti* (HAWLEY, 1988).

O *Ae. albopictus* apresenta cor negra, com uma faixa estreita longitudinal, mediana e branco-prateada, e patas marcadas de branco e preto. As fêmeas vivem mais tempo que os machos, chegando a viver de quatro a oito semanas em laboratório e de três a seis meses em campo. A espécie é encontrada também em ambiente silvestre, o que dificulta sua eliminação pelos programas de controle urbanos. O mosquito é considerado vetor secundário do DENV nas Américas, por não ser muito doméstico e nem muito antropofílico, no entanto, ainda que haja a eliminação do *Ae. aegypti*, existe risco de transmissão do vírus pelo *Ae. albopictus*. Algumas áreas da Indonésia têm sido alvo de surtos de dengue com frequência, nas partes rurais do país, onde o *Ae. albopictus* é a espécie predominante. Na Ásia, este mosquito tem um papel importante na transmissão da Encefalite Japonesa e *Dirofilaria immitis* (HAWLEY, 1988; WERNER et al., 2012). Experimentos em laboratório com mosquitos coletados no Caribe (Martinica e Guadalupe), América do Norte (sul dos EUA) e América do Sul (Brasil e Guiana Francesa), mostraram que tanto o *Ae. albopictus* quanto o *Ae. aegypti*, são vetores competentes para o ZIKV (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

A rápida capacidade de dispersão do *Ae. albopictus*, aliada à potencialidade para ocupar diferentes ambientes e de se alimentar do sangue de diferentes mamíferos, induziu pesquisadores a levantarem hipótese sobre a potencialidade desta espécie atuar como vetora da febre amarela e da dengue nas Américas. A participação desta espécie na transmissão desses vírus poderia modificar a epidemiologia da transmissão destas enfermidades nesta região do mundo (MITCHELL, 1991; BORGES, 2001; REZZA et al., 2012; BONIZZONI et al., 2013).

1.4 Xenomonitoramento de Dengue vírus em mosquitos de campo

A circulação de DENV depende da forma em que se organiza o espaço geográfico dos centros urbanos, a migração humana, o modo de vida de suas populações e os seus reflexos no ambiente. Esses fatores criam condições para a proliferação dos vetores, bem como a circulação e introdução de cepas virais. Em muitas regiões tropicais as deficiências no abastecimento de água encanada fazem com que muitos habitantes passem a armazenar o líquido em depósitos nos domicílios. Por sua vez, a aglomeração humana propicia condições para o aumento do número de mosquitos que entram em contato com a população. Outro hábito encontrado nas comunidades vem a ser o acúmulo de lixo, no qual é possível encontrar recipientes passíveis de servir como criadouros (FORATTINI, 2002; PINHEIRO; TADEI, 2002).

Além disso, a propagação de vírus causadores da dengue é facilitada pelo aumento da intensidade e velocidade do tráfego aéreo e terrestre. Esses agentes etiológicos podem ser rapidamente transportados no sangue de pessoas portadoras da infecção, e, como o período de viremia é de aproximadamente oito dias, facilita sua disseminação pelo mosquito vetor (GUBLER, 1997).

Atualmente, o eixo dos programas de controle da dengue tem sido o combate aos mosquitos vetores mediante a vigilância vetorial e a aplicação de inseticidas, que vem apresentando baixa eficácia e altos custos (PENNA, 2003; MACIEL et al., 2008). O desenvolvimento de uma vacina, com eficácia e segurança, permitiria o controle da doença, de maneira semelhante ao controle da febre amarela. Esta situação representa um desafio, pois grande parte dos municípios brasileiros não apresenta estrutura física, como a existência de laboratórios para a realização de análises moleculares que agilizem o diagnóstico (MACIEL et al., 2008).

Atualmente, a vacina para uso preventivo contra a dengue, encontra-se em fase de desenvolvimento. O Instituto Butantan, no Estado de São Paulo, e a Fundação Oswaldo Cruz,

no Estado do Rio de Janeiro, são instituições públicas que têm realizado testes com a vacina no Brasil. Na vertente privada, o laboratório Sanofi-Pasteur realizou testes com a vacina candidata, em 13 países; essa vacina é composta por quatro cepas recombinantes vivas atenuadas de vírus da dengue e tem como base a cepa da vacina febre amarela 17D (YF 17D) (GUY et al., 2011) e teve aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em dezembro de 2015, para ser comercializada (ABRASCO, 2016).

Considerando-se esta realidade, a detecção de DENV por RT-PCR em mosquitos vetores se mostra uma importante ferramenta na vigilância epidemiológica. A presença de vírus em mosquitos coletados em campo permite sua detecção de seis a oito semanas antes do início de uma epidemia (PINHEIRO et al., 2005; URDANETA et al., 2005; ZEIDLER et al., 2008; COSTA et al., 2009). Vários protocolos de RT-PCR em amostras clínicas para detecção e identificação de sorotipos do DENV têm sido utilizados em vários países (LANCIOTTI et al., 1992; HOUNG et al., 2001; JOHNSON et al., 2005).

As vantagens da RT-PCR se referem a uma maior rapidez, sensibilidade e capacidade para detectar vírus não viáveis do que nos sistemas de isolamento que amplificam apenas vírus viáveis (GURUKUMAR et al., 2009; LEPARC-GOFFART et al., 2009). No entanto, a RT-PCR notoriamente é mais propensa à contaminação, apesar de conseguir detectar alguns sorotipos, genótipos, ou cepas de DENV, mesmo com sua grande variação de sequências. É sempre desejável a utilização de iniciadores que amplifiquem diferentes regiões de genes para a detecção de diferentes cepas, bem como suas possíveis variantes. O desenvolvimento recente de ensaios de RT-PCR em Tempo Real tem melhorado a detecção da infecção por DENV. Os ensaios desta técnica têm muitas vantagens sobre os métodos convencionais de RT-PCR, incluindo a rapidez, a medição quantitativa, menor taxa de contaminação, maior sensibilidade, maior especificidade e fácil padronização (SHU; HUANG 2004; KONG et al., 2006; MOUREAU et al., 2007).

1.4.1 RT-PCR em Tempo Real na identificação de Dengue virus

A RT-PCR em Tempo Real (ou RT-qPCR), assim como a RT-PCR convencional permite que fragmentos genômicos sejam amplificados, no entanto, a detecção dos produtos é feita diretamente na plataforma de instrumentação, utilizando-se marcadores fluorescentes e métodos sensíveis de mensuração da fluorescência emitida. Como não requer manipulação após a amplificação, o método é considerado um sistema fechado ou homogêneo, e tem como vantagens a redução de tempo na realização do teste, a diminuição do risco de contaminação,

bem como a possibilidade de se quantificar a carga viral por comparação com uma curva padrão (NIESTERS, 2002).

Na fase exponencial da amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado threshold ou limiar, e é calculado em função da fluorescência basal (background). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado por cada amostra é consideravelmente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este limiar pré-estabelecido é chamado de Ciclo threshold (C_T), o qual é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação. A fluorescência emitida é captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde o software faz a análise final dos dados (POERSCH et al., 2005).

Várias estratégias de marcação vêm sendo utilizadas para detecção do fragmento amplificado. Algumas usam substâncias fluorescentes que se ligam ao DNA de fita dupla como SYBR Green, e outras usam sondas marcadas, a exemplo do ensaio fluorogênico da atividade 5' nuclease (TaqMan[®]), sonda de hibridização molecular beacons (oligonucleotídeos que formam uma estrutura secundária entre as extremidades 5' e 3') e sonda de hibridização Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). As estratégias que utilizam fluoróforos como o SYBR Green são baseadas na ligação deste corante com o DNA de fita dupla amplificado na reação, o que garante sua sensibilidade, mas com uma especificidade inferior ao daqueles que usam sondas marcadas. A especificidade do produto amplificado é determinada pela análise da curva de dissociação, a qual permite calcular a temperatura de desnaturação (temperatura de melting – T_m) do produto amplificado que depende do tamanho e da sequência da mesma (POLONI, 2009).

O presente trabalho visou xenomonitorar as populações das espécies vetoras *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* para a presença do DENV em três Distritos Sanitários (DS) de Belo Horizonte, Minas Gerais em diferentes períodos de tempo. Propõe-se que o xenomonitoramento rotineiro da presença do patógeno nestas populações levará a identificação de áreas com alta ou baixa densidade de mosquitos infectados em períodos anteriores a ocorrência de casos de dengue em seres humanos. A adequação da metodologia, bem como os resultados obtidos neste estudo, poderão auxiliar na implantação de ações de controle mais rápidas, direcionadas e efetivas pelos órgãos de vigilância locais a fim de reduzir os impactos na Saúde Pública em epidemias no futuro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Xenomonitorar fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, coletadas nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, para a presença de Dengue virus em Belo Horizonte, Minas Gerais, durante o período de quatro anos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar a densidade populacional de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* nos quatro períodos de coleta e nos três DS de Belo Horizonte, Minas Gerais;
- b) Associar a densidade populacional de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* com os fatores climáticos índice pluviométrico, temperaturas máxima e mínima e umidade relativa do ar;
- c) Correlacionar a densidade populacional de fêmeas de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* nos quatro períodos de coleta e nos três DS de Belo Horizonte, Minas Gerais;
- d) Verificar comparativamente a presença de exemplares de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* positivos para o DENV e a ocorrência de casos da doença nos DS incluídos no estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

A pesquisa foi desenvolvida no município de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais, localizada na região centro-sul do Estado, à latitude de 19°49'01", longitude de 43°57'21" e a 852 m de altitude acima do nível do mar. O município pertence à região Metropolitana de Belo Horizonte e à microrregião de Belo Horizonte. Apresenta uma área de 331.400 Km², com população de 2.375.151 habitantes e densidade demográfica de 7.167,02 hab./Km² de acordo com o Censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2010 (IBGE, 2012).

Em Belo Horizonte existem ribeirões e vários córregos, que são na sua maioria canalizados. A capital possui duas sub-bacias afluentes do Rio das Velhas: Ribeirão Arrudas e Ribeirão da Onça, que são afluentes do Rio das Velhas (UFMG, 2003). O clima é tropical com estação seca, próximo ao clima subtropical úmido, com temperaturas médias anuais entre 17°C e 20°C. O inverno é caracterizado por baixas temperaturas e pouca precipitação. No verão, temperaturas elevadas e ocorrência de chuvas são observadas (PBH, 2012b). A umidade relativa do ar gira em torno de 65% e a média anual de chuvas é de aproximadamente 1.300 mm, que são mais frequentes no período de outubro a março (INMET, 2012a).

O município de Belo Horizonte está dividido em nove Distritos Sanitários (DS): Barreiro, Centro-Sul, Leste, Nordeste, Noroeste, Norte, Oeste, Pampulha e Venda Nova (PBH, 2012c) (Figura 6). Contudo, no presente estudo, somente os DS Pampulha, Norte e Leste foram avaliados:

- a) Pampulha: apresenta a bacia da Pampulha formada por oito afluentes. A área total desta bacia é de 97 Km², que corresponde a 42 Km² no município de Belo Horizonte. Nessa região, verifica-se uma população estratificada em diversos níveis socioeconômicos (PBH, 2012c).
- b) Norte: possui a maior área verde da capital, que é destinada a parques e áreas de conservação permanente. Este DS é dividido por quatro córregos: Vilarinho, Bacuraus, Isidoro e Onça. Essa região, nos últimos anos, é considerada fronteira de expansão da capital. É marcada por contrastes, pois se localiza entre bairros que apresentam melhor infraestrutura com moradores com maior poder aquisitivo e bairros em condições mais precárias (PBH, 2012c).

- c) Leste: situa-se quase totalmente na bacia do Ribeirão Arrudas e apresenta áreas pouco ocupadas. Ainda nessa localidade atividades primárias (agricultura e mineração) são desenvolvidas em meio a áreas de ocupação irregular. Notam-se problemas de infraestrutura, transporte e saneamento (PBH, 2012c).

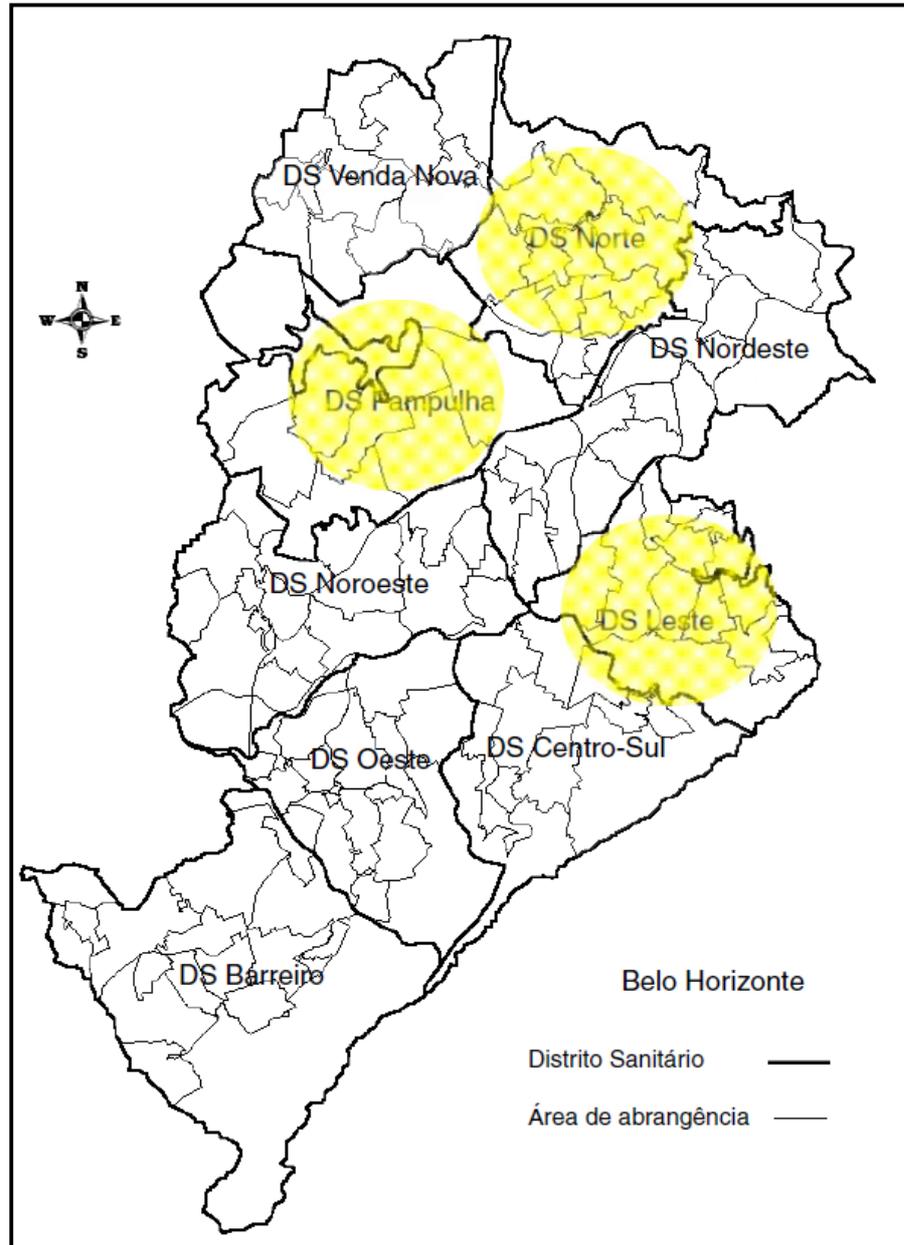


FIGURA 6: Mapa dos Distritos Sanitários e áreas de abrangência das unidades básicas de saúde do município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Em amarelo, observam-se os DS avaliados no presente estudo.

Fonte: Adaptado de Corrêa et al. (2005).

Esses três DS foram selecionados seguindo os seguintes critérios considerados importantes para o presente estudo:

- a) Alta incidência de casos de dengue nos últimos anos, registrados nesses DS, segundo dados divulgados pela Secretaria Municipal de Saúde (SMS) (PBH, 2012a).
- b) De acordo com estudos prévios de competência vetorial de populações de *Ae. aegypti* na cidade de Belo Horizonte (GONÇALVES, 2010; GONÇALVES et al., 2014); os DS Pampulha, Norte e Leste apresentaram mosquitos com competência vetorial ao DENV-2 em três níveis: baixo, médio e alto, respectivamente. Competência vetorial trata da capacidade que um vetor tem de se infectar e transmitir um determinado patógeno.

3.2 Armadilha para a coleta dos culicídeos

Para a coleta dos mosquitos foram utilizadas armadilhas BG-Sentinel Full Version[®] (Biogents AG, Regensburg, Alemanha). Elas apresentam 35 cm de diâmetro e pesam cerca de 800 g, e são compostas pelos seguintes itens: funil escuro, saco escuro para revestimento da parte interior do funil, dois sacos escuros para a armazenagem dos insetos, cobertura de organza branca, plástico branco que envolve os demais componentes, três hastes plásticas de montagem para sustentação da armadilha, tubo acoplado a um ventilador com sistema de rotação invertido para sucção interior e cabo de energia (Figura 7).



FIGURA 7: Armadilha BG-Sentinel Full Version[®] desmontada e seus respectivos componentes.

Fonte: Adaptado de Biogents (2008). Disponível em: <http://www.bg-sentinel.com>.

A armadilha contém um atrativo químico (BG-Lure[®]) (Biogents AG, Regensburg, Alemanha) que libera substâncias não tóxicas semelhantes às existentes na pele humana capazes de atrair os mosquitos. Esses compostos são: o amoníaco, o ácido láctico e os ácidos graxos, em especial o ácido capróico. O atrativo era colocado em um bolso de malha preto localizado na parte externa do tubo de sucção da armadilha. Ao ser ligada em energia elétrica, o ventilador gira e dispersa os odores do atrativo pela cobertura de organza branca e, ao mesmo tempo, o fluxo de ar no tubo de sucção faz com que os mosquitos que estejam próximos ao funil escuro sejam capturados e armazenados no saco escuro situado no interior deste tubo (Figuras 7 e 8).



FIGURA 8: Armadilha BG-Sentinel Full Version[®] em funcionamento. As setas vermelhas indicam o fluxo de ar gerado pelo ventilador que dispersa os odores do atrativo químico. As setas amarelas indicam o direcionamento dos mosquitos que são atraídos e permanecem próximos ao funil escuro.

Fonte: Biogents (2008). Disponível em: <http://www.bg-sentinel.com>.

Os atrativos químicos tinham validade de seis meses e eram substituídos por novos ao término deste prazo. Para manutenção de seu odor, cada atrativo químico era acondicionado em geladeira -20°C , quando não utilizado nas armadilhas, seguindo as orientações do fabricante.

3.3 Períodos de coleta

Neste estudo foram realizadas capturas de culicídeos nos períodos de transmissão de dengue entre os anos de 2010 e 2014. Baseado em um período de captura no inverno, entre os meses de junho e setembro de 2011, em que houve redução relevante da quantidade de

mosquitos coletados, optou-se por não se realizar coletas nessa estação, nos períodos seguintes.

Ao término de cada semana de coleta, um relatório era repassado à SMS de Belo Horizonte, contendo informações sobre os vetores capturados e sobre a presença/ausência de mosquitos infectados pelo DENV. Essas informações tornaram-se fundamentais para que o Centro de Controle de Zoonoses da SMS atuasse desenvolvendo ações focais para a eliminação do vetor nestas áreas de grande risco.

Destaca-se que para organização dos resultados e confecção dos gráficos e tabelas, assim como para comparação com os dados epidemiológicos da dengue no município, no presente estudo, adotou-se a ordem de semanas do ano, que apresenta um total de 52. Portanto, a primeira semana do ano em janeiro foi nomeada semana 1 e a última semana em dezembro foi nomeada semana 52. Considerou-se como início de cada semana de coleta o domingo, e o término o sábado (Tabela 1).

TABELA 1: Caracterização dos períodos de coleta de culicídeos, com destaque aos anos, meses e semanas de captura.

Período	Meses/Anos	Semanas epidemiológicas
Primeiro	Dezembro/2010 a Maio/2011	50 ^a de 2010 à 21 ^a de 2011
Segundo	Outubro/2011 a Maio/2012	41 ^a de 2011 à 22 ^a de 2012
Terceiro	Outubro/2012 a Maio/2013	40 ^a de 2012 à 22 ^a de 2013
Quarto	Outubro/2013 a Maio/2014	40 ^a de 2013 a 22 ^a de 2014

3.4 Coleta dos culicídeos

Em cada DS avaliado foram instaladas 20 armadilhas, totalizando 60. O programa MapInfo Professional version 10.0 (2009) (MapInfo®, USA) foi utilizado para a seleção dos locais de instalação das armadilhas de captura. Essa seleção foi baseada no mapa de Belo Horizonte, disponibilizado pela SMS, onde os nove DS são evidenciados (Figura 9).

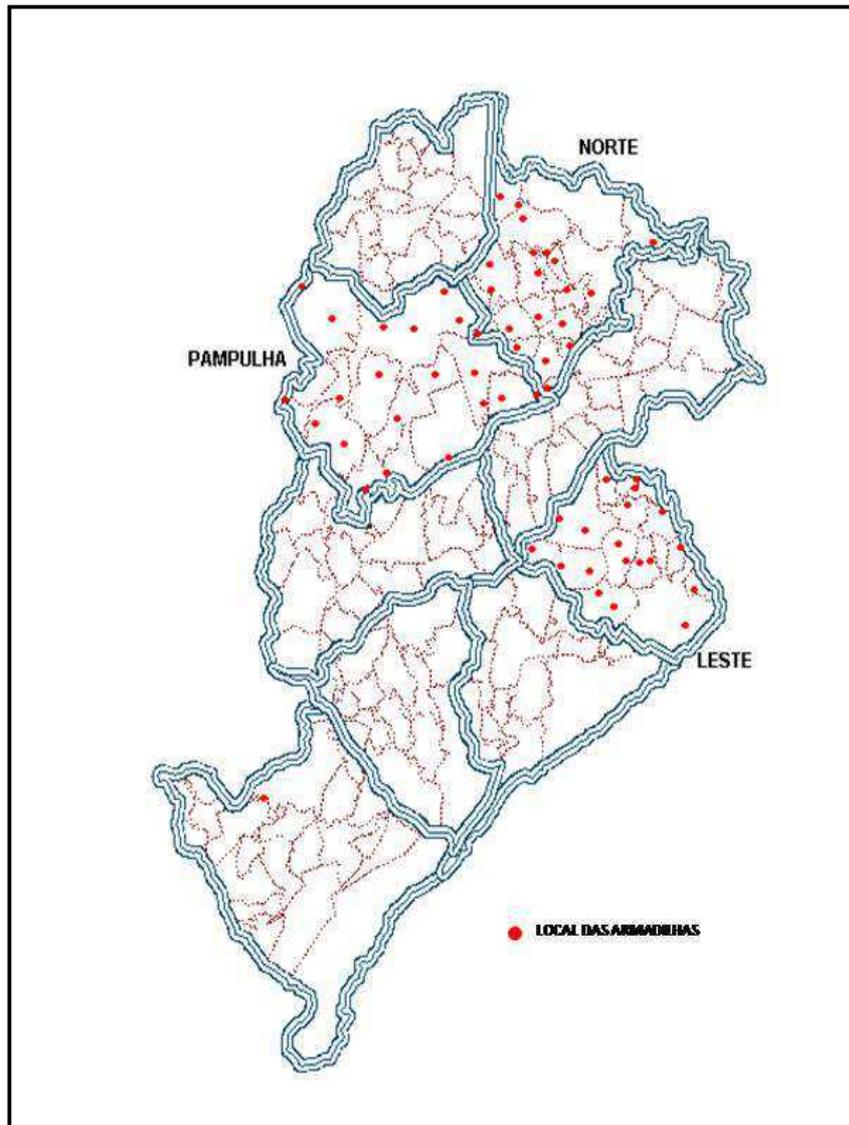


FIGURA 9: Mapa do município Belo Horizonte, evidenciando os locais de instalação das armadilhas nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste.

Fonte: Adaptado de PBH (2010).

Em cada DS, as armadilhas receberam a seguinte numeração: Pampulha – armadilhas 1 a 20, Norte – armadilhas 21 a 40, e Leste – armadilhas 41 a 60. As armadilhas eram montadas às segundas-feiras e desmontadas às quintas-feiras. A coleta era realizada, por meio do recolhimento do saco escuro colocado no interior da armadilha, às terças, às quartas e às quintas-feiras. No caso de falha na coleta pelo desligamento ou quando se percebia o não funcionamento de alguma armadilha, o esforço de coleta era prolongado até a sexta-feira. Nesse momento, a armadilha era desmontada e o saco para captura era recolhido. As equipes do Laboratório de Entomologia Médica (CPqRR/FIOCRUZ-MG) que exerciam o trabalho de campo eram acompanhadas pelos agentes responsáveis pelo controle da dengue vinculadas à SMS dos respectivos DS.

Em relação à escolha do local de instalação da armadilha, os seguintes fatores foram considerados a fim de facilitar a captura dos mosquitos: sombreamento e proteção contra chuva; movimentação de pessoas; e, proximidade com instalações de energia elétrica no intra e peridomicílio. No caso de imóveis particulares, o responsável pelo mesmo assinava um termo de autorização da instalação da armadilha e visita dos técnicos para condução da pesquisa (Apêndice 1).

Os sacos com os espécimes foram acondicionados em sacolas plásticas do tipo ziplock. Esses sacos foram mantidos em caixas de isopor resfriadas por bolsas de gelo durante o transporte ao Laboratório de Entomologia Médica (CPqRR/FIOCRUZ-MG) para posterior identificação (Tabela 2).

TABELA 2: Cronograma das coletas de mosquitos em Distritos Sanitários de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Dia da semana	Atividades
Segunda-feira	Montagem das armadilhas
Terça-feira	Recolhimento de saco contendo os espécimes
Quarta-feira	Recolhimento de saco contendo os espécimes
Quinta-feira	Desmontagem das armadilhas e recolhimento de saco contendo os espécimes
Sexta-feira	Retorno ao campo em caso de falha ou desligamento da armadilha

3.5 Identificação dos culicídeos

Para a identificação dos espécimes, foram utilizadas chaves de identificação de Forattini (2002) e microscópio estereoscópico Carl Zeiss Stemi DV4 (Zeiss®, Jena, Alemanha). Os mosquitos foram separados e identificados por espécie, sexo, armadilha, DS e data de coleta. Os exemplares eram armazenados em tubos cônicos (tipo eppendorf) de 1,5 mL DNase/RNase free e mantidos em freezer a -70°C , até o momento das análises moleculares.

As fêmeas de *Ae. aegypti* foram separadas em tubos cônicos, formando pools, que continham de um até 10 exemplares, separados por armadilha e dia de coleta. As armadilhas que capturaram mais de 10 fêmeas desta espécie por dia, tiveram seus exemplares divididos em dois ou mais tubos. Já as fêmeas de *Ae. albopictus*, devido ao seu menor número, foram separadas individualmente também por armadilha e dia de coleta. As demais espécies de

mosquitos coletadas, apesar de não terem sido utilizadas nesta pesquisa, foram armazenadas em tubos cônicos e mantidas a -70°C .

3.6 Extração de RNA viral

Os mosquitos (pools de fêmeas de *Ae. aegypti* e fêmeas de *Ae. albopictus* separadas individualmente) foram macerados em tubos cônicos de 1,5 mL DNase/RNase free, com auxílio de pistilo plástico e macerador Pellet Pestle[®] Motor (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, Missouri), em 200 μL de Tampão Salina Fosfato (Phosphate Buffered Saline – PBS). Após centrifugação por 15 segundos a 8.000 rpm, 140 μL do sobrenadante foram processados para extração do RNA viral com a utilização do QIAamp[®] Viral RNA mini Kit (Qiagen[®], Venlo, Limburgo) de acordo com as orientações do fabricante. Após a extração, as amostras com RNA extraído, foram acondicionados em freezer a -70°C .

3.7 RT-PCR em Tempo Real

Para realização da RT-PCR em Tempo Real foi utilizado o kit Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step (Applied Biosystems[®], Califórnia, Estados Unidos) (Tabela 3). Os iniciadores usados para todos os DENV foram:

- a) Primer Forward: 5'-AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA-3';
- b) Primer Reverse: 5'-CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT-3'.

Esses iniciadores foram desenhados a partir de sequências completas dos quatro sorotipos de DENV, de sequências parciais do capsídeo e da região 3' não-codificadora de DENV4, isoladas em diferentes áreas geográficas do mundo, de acordo com Leparc-Goffart et al. (2009).

TABELA 3: Componentes do kit Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step.

Mix de Enzima Transcriptase Reversa ArrayScript [™] Ultra Pure Reverse Transcriptase RNAse inhibitor	Mix Power SYBR [®] Green RT-PCR SYBR [®] Green I Dye AmpliTaq Gold [®] DNA Polimerase (Ultra Pure) dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP e dUTP) ROX [™] Passive Reference Optimized buffer components
--	--

dNTPs – desoxirribonucleotídeos fosfatados.

As reações de RT-PCR em Tempo Real foram realizadas em placas MicroAmp[®] Fast Optical 96 – Well Reaction Plate with Barcode (0,1 mL) (Applied Biosystems[®], Califórnia,

Estados Unidos), em um volume total de 15 μ L por poço. O padrão, as amostras e o controle positivo (RNA viral extraído de cultura de células C6/36 de *Ae. albopictus* infectada em laboratório com DENV-2), foram distribuídos em duplicatas na placa e o branco da reação (No Template Control – NTC) em quadruplicata. Após aplicação de todos os componentes, a placa foi vedada com o MicroAmp[®] Optical Adhesive Film (Applied Biosystems[®], Califórnia, Estados Unidos). O mix da reação continha os reagentes citados na Tabela 4.

TABELA 4: Mix da reação de RT-PCR em Tempo Real.

Reagente	Volume para uma reação
Mix Power SYBR [®] Green RT-PCR	7,5 μ L
Primer Forward (10 pmol)	0,3 μ L
Primer Reverse (10 pmol)	0,3 μ L
Mix de Enzima Transcriptase Reversa	0,15 μ L
Água tratada com DEPC	3,75 μ L
Amostra	3 μ L
Volume final	15 μL

DEPC – dietilpirocarbonato.

As reações de RT-PCR em Tempo Real foram processadas na plataforma 7500 Fast Real-Time Systems (Applied Biosystems[®], Califórnia, Estados Unidos). Os ciclos foram realizados nas condições mostradas na Tabela 5 (LEPARC-GOFFART et al., 2009; GONÇALVES, 2010; GONÇALVES et al., 2014).

TABELA 5: Programação da máquina de RT-PCR em Tempo Real.

Etapas da reação	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Transcrição reversa	48	30 minutos	1
Ativação da enzima DNA polimerase AmpliTaq Gold [®]	95	10 minutos	1
Desnaturação	95	15 segundos	40
Anelamento e extensão	60	1 minuto	40

3.8 Construção da curva padrão

A curva construída apresentou padrões (P) que variaram de 300.000 a 3 cópias. Estes padrões foram construídos a partir de diluições seriadas de plasmídeos que continham as sequências alvo de DNA complementar (cDNA) de DENV anteriormente digerido e purificado, de acordo com as orientações do manual do fabricante Applied Biosystems® (2008). A curva foi obtida correlacionando-se a concentração de DNA (em número de cópias) com o momento em que a quantidade de luz de cada tubo atinge o C_T . Os números de cópias de cDNA de DENV referentes a cada padrão foram: P1 – 300.000 cópias, P2 – 30.000, P3 – 3.000, P4 – 300, P5 – 30, e P6 – 3 cópias. Essa metodologia foi padronizada e adotada em estudos prévios realizados pelo Laboratório de Entomologia Médica (GONÇALVES, 2010; GONÇALVES et al., 2014).

3.9 Critério de positividade e negatividade para a pesquisa de RNA de Dengue virus nas amostras de campo

A pesquisa de RNA de DENV foi considerada positiva quando: a) as amostras apresentaram Ciclo de threshold (C_T) ≤ 35 (CHEN et al., 2010); b) as amostras foram identificadas no intervalo da curva padrão (entre P1 e P6); e c) pela análise da curva de dissociação (curva de melting), segundo as orientações do fabricante Applied Biosystems® (2008) e de acordo com os estudos de Gonçalves (2010) e Gonçalves et al. (2014).

3.10 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos referentes ao índice pluviométrico, temperatura (máxima e mínima) e umidade relativa do ar, em Belo Horizonte, foram obtidos, pela consulta semanal no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2010, 2011, 2012b, 2013, 2014), no módulo Estações Automáticas. As informações do município eram alimentadas na homepage, pela Estação Meteorológica da Pampulha. As informações foram acessadas pelo endereço eletrônico [http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo.php?QTUyMQ==] durante todo o período de estudo.

3.11 Casos de Dengue

Os casos de dengue notificados semanalmente nos três DS em estudo eram informados por membros da SMS de Belo Horizonte, para o acompanhamento da epidemiologia da doença no município. Estas informações também puderam ser acessadas pelo endereço eletrônico da PBH (PBH, 2010, 2011, 2012a, 2013, 2014).

3.12 Análise estatística

Os dados referentes à quantidade de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados nos quatro períodos de estudo, por DS, foram avaliados quanto à distribuição normal, por meio do teste de Shapiro-Wilk. Como estes não se ajustaram à distribuição normal, análises não-paramétricas correspondentes foram utilizadas. Para examinar se houve diferença nas medianas de mosquitos coletados por períodos de coleta e/ou DS, foi utilizada a análise de Kruskal-Wallis (H). Quando constatada a diferença, utilizou-se o teste de Dunn (AYRES et al., 2007).

O valor de H calculado para cada análise foi comparado ao valor de H definido na tabela de quantis para a estatística de teste de Kruskal-Wallis. Sempre que o valor calculado era maior do que o apresentado na tabela a um determinado grau de liberdade, considerando a quantidade de grupos comparados, e o valor de p era menor ou igual a 0,05, rejeitou-se a hipótese de medianas iguais, e prosseguiu-se com o teste de Dunn (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

Para examinar a relação entre quantidade de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* capturados frente às variáveis climáticas (índice pluviométrico semanal, temperatura médias semanais máxima e mínima, e umidade relativa do ar média semanal) foi utilizada a correlação de Spearman (r_s) (AYRES et al., 2007). Para se caracterizar que houve correlação entre as variáveis analisadas, era preciso que o valor de p fosse menor ou igual a 0,05. Além disso, a correlação foi considerada positiva quando o valor de r_s foi maior que 0 e negativa quando este valor foi menor que 0. O valor de r_s pode variar entre 1 e -1. Quanto mais se aproxima desses valores extremos, mais forte é a correlação (seja positiva ou negativa) (AYRES et al., 2007).

A correlação de Spearman (r_s) também foi usada para se determinar a relação entre fêmeas coletadas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em todo o período de estudo, nos três DS (AYRES et al., 2007).

Em todos os testes realizados, o nível de significância adotado para se rejeitar a hipótese nula foi de 5%. O banco dados deste estudo foi elaborado utilizando-se o software Microsoft Excel 2007 e as análises de dados foram realizadas por meio do pacote estatístico GraphPad Prism version 5.03 (La Jolla, CA, USA).

Os valores de p, significativos ao nível citado (5%), foram destacados no texto, tabelas e gráficos com asterisco (*). Para $p \leq 0,05$ adotou-se um asterisco (*), para $p \leq 0,01$ utilizou-se dois asteriscos (**) e para $p \leq 0,0001$ foram adotados três asteriscos (***) (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

4 RESULTADOS

4. 1 *Aedes aegypti*

4.1.1 Captura de culicídeos

As fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas nos quatro períodos totalizaram 10.662 exemplares. Desse total 1.504 (14,10%), 2.516 (23,59%), 3.728 (34,98%) e 2.914 (27,33%) foram coletadas respectivamente em cada um dos quatro períodos deste estudo (Gráfico 1A). Em relação aos DS de coleta, foram capturadas 4.066 (38,13%) fêmeas de *Ae. aegypti* no DS Pampulha, 4.287 (40,22%) no DS Norte e 2.309 (21,65%) no DS Leste (Gráfico 1B).

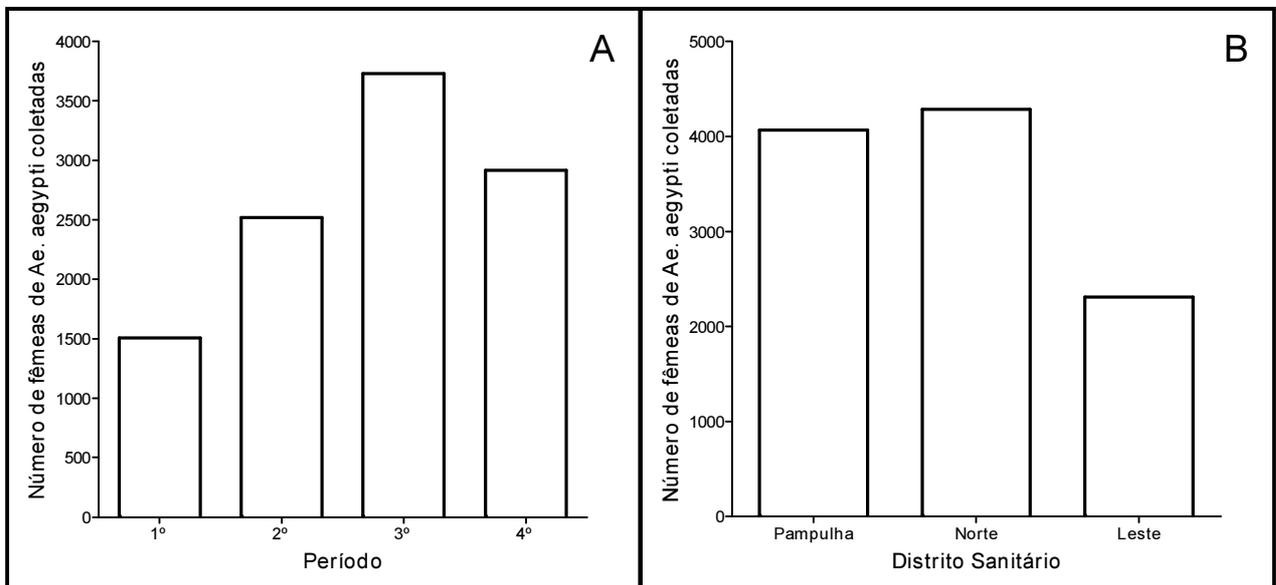


GRÁFICO 1: Número de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas em todo o estudo. (A) Distribuição de exemplares por período de coleta. (B) Distribuição de exemplares por Distrito Sanitário.

Houve diferença estatisticamente significativa na comparação das medianas de mosquitos coletados entre os períodos ($H = 12,94$; $***p < 0,0001$) e entre os DS ($H = 51,20$; $***p < 0,0001$), pelo teste de Kruskal-Wallis. A mediana de mosquitos do terceiro período foi significativamente maior que a do primeiro ($***p < 0,0001$) e a do segundo período ($***p < 0,0001$) (Gráfico 2A); e as medianas de mosquitos coletados no DS Pampulha ($***p < 0,0001$) e no DS Norte ($***p < 0,0001$) foram significativamente maiores que a do DS Leste (Gráfico 2B).

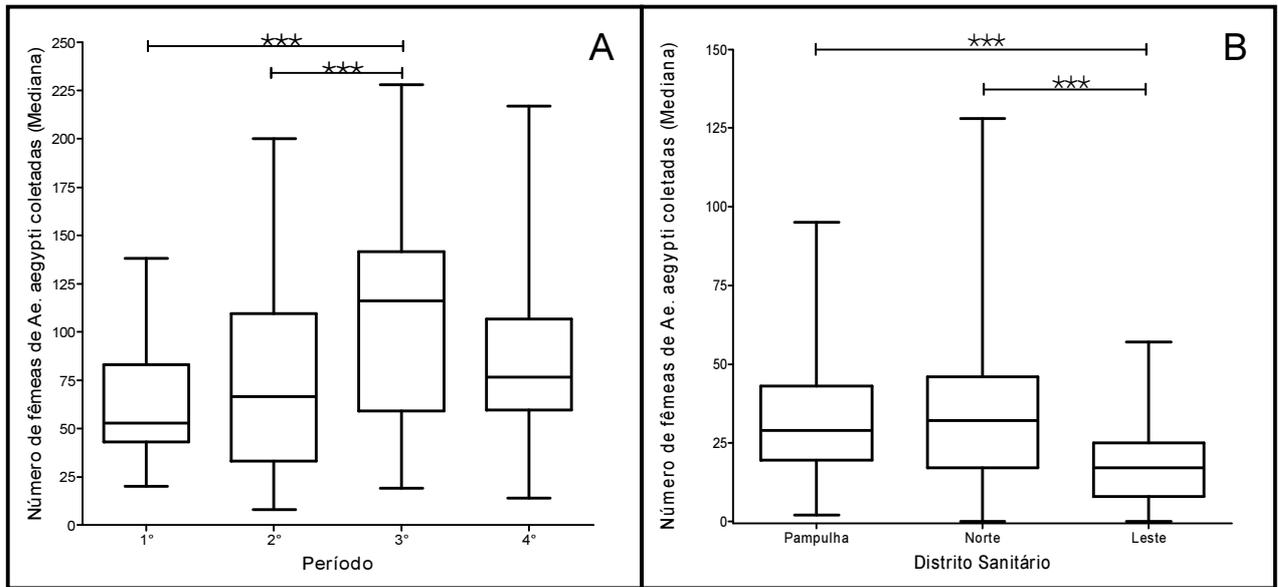


GRÁFICO 2: Comparação entre medianas referentes às fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas em todo o estudo. (A) Comparação entre os períodos de coleta. (B) Comparação entre os Distritos Sanitários. *** $p < 0,0001$.

4.1.1.1 Primeiro período de coleta

A semana 13 (março de 2011) foi a de maior número de espécimes de *Ae. aegypti* do período, com 138 (9,29%), e a semana 50 (dezembro de 2010) apresentou o menor valor, com a coleta de 20 fêmeas (1,32%). No entanto, o maior volume de chuvas foi registrado na semana 1 (janeiro de 2011), com 168,5 mm³ (Gráfico 3). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 15°C e 31,4°C, e a umidade relativa do ar, entre 50,90% e 77,60% no período (INMET, 2010; 2011).

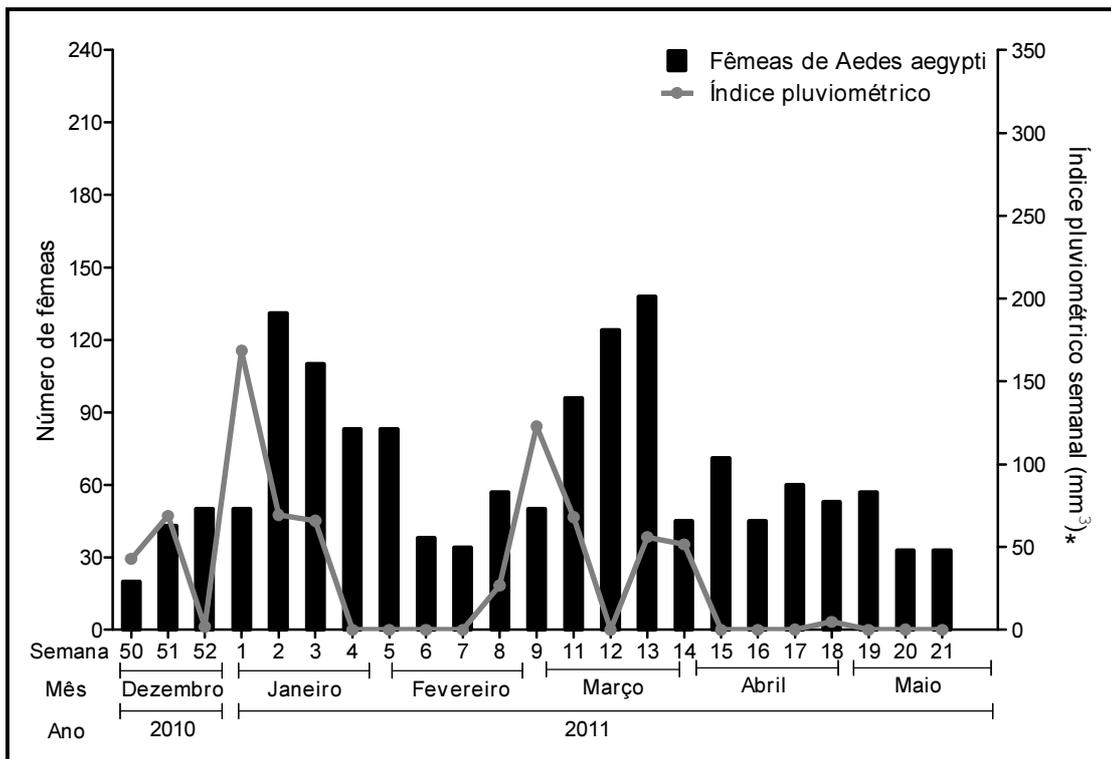


GRÁFICO 3: Número de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas e índice pluviométrico semanal, no primeiro período, nos Distritos Sanitários em estudo.

Fonte: INMET (2010, 2011)*.

4.1.1.2 Segundo período de coleta

Nesse período, a semana 3 (janeiro de 2012) se destacou como a de maior número de exemplares de *Ae. aegypti* coletados, com 200 mosquitos (8,10%). A menor captura foi registrada na semana 41 (outubro de 2011), com oito mosquitos (0,31%). Observou-se que o maior volume de chuvas foi notificado na semana 50 (dezembro de 2011), com 307,5 mm³ (Gráfico 4). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 15,4°C e 31,7°C, e a umidade relativa do ar variou de 45,10% a 83,60% no período (INMET, 2011; 2012b).

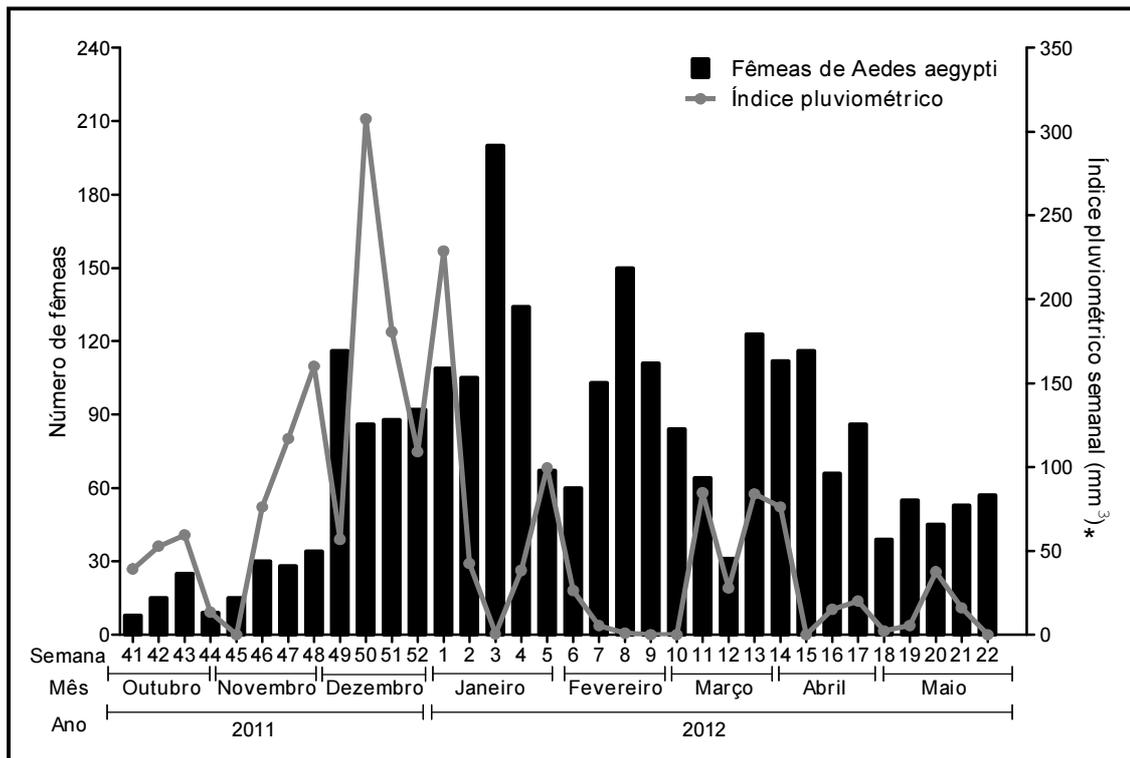


GRÁFICO 4: Número de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas e índice pluviométrico semanal, no segundo período, nos Distritos Sanitários em estudo.

Fonte: INMET (2011, 2012b)*.

4.1.1.3 Terceiro período de coleta

Na semana 51 (dezembro de 2012) houve o maior número de mosquitos coletados, totalizando 228 exemplares (6,30%). A semana 40 (outubro de 2012) apresentou o menor resultado com a captura de 19 fêmeas (0,50%). O maior índice pluviométrico foi registrado na semana 4 (janeiro de 2013), com 159,6mm³ (Gráfico 5). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 14,8°C e 33,4°C, e a umidade relativa do ar, entre 45,50% e 81,20% no período (INMET, 2012b; 2013).

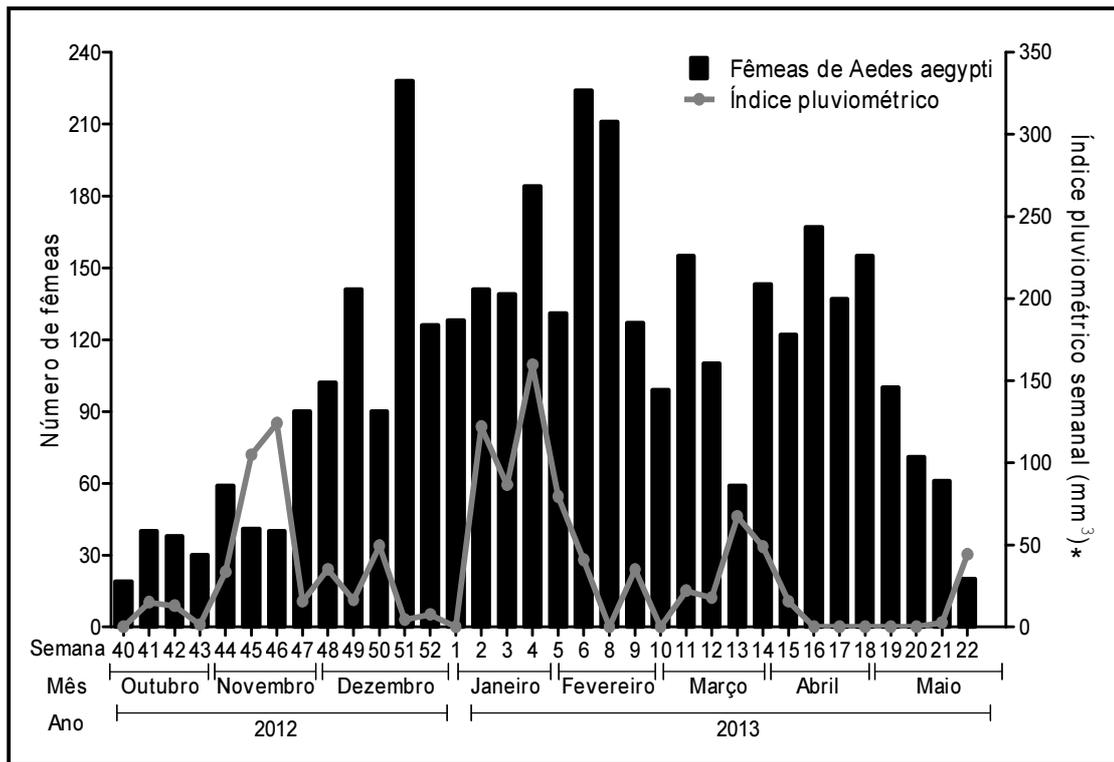


GRÁFICO 5: Número de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas e índice pluviométrico semanal, no terceiro período, nos Distritos Sanitários em estudo.

Fonte: INMET (2012b, 2013)*.

4.1.1.4 Quarto período de coleta

Na semana 1 (janeiro de 2014) houve o maior número de mosquitos coletados, totalizando 217 espécimes (7,44%). A semana 41 (outubro de 2013) apresentou o menor resultado, com a coleta de 14 fêmeas (0,48%). O maior índice pluviométrico foi registrado na semana 51 (dezembro de 2013), com 265,6mm³ (Gráfico 6). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 14,8°C e 32,8°C, e a umidade relativa do ar variou de 51,70% a 80,00% no período (INMET, 2013; 2014).

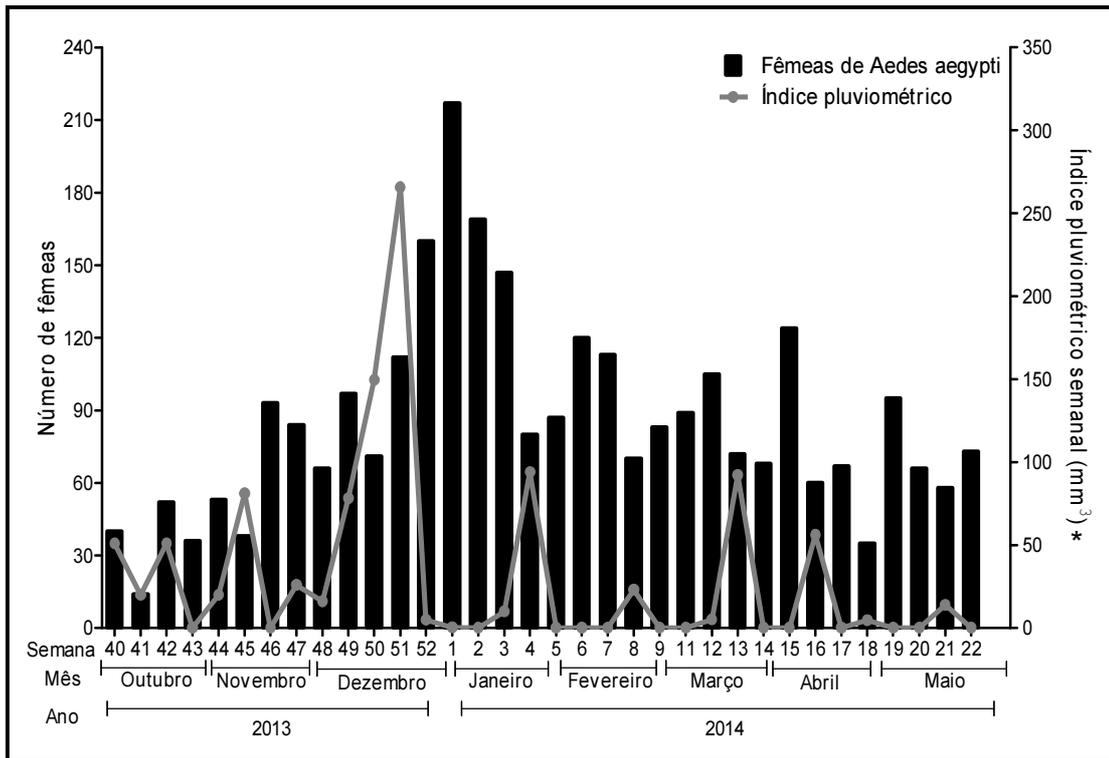


GRÁFICO 6: Número de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas e índice pluviométrico semanal, no quarto período, nos Distritos Sanitários em estudo.

Fonte: INMET (2013, 2014)*.

4.1.2 Correlação entre número de fêmeas de *Aedes aegypti* e fatores climáticos considerando todo o período de estudo

Não houve associação entre pluviosidade e número de espécimes de *Ae. aegypti* coletados, considerando-se todo o período de estudo. No entanto, houve correlação positiva entre quantidade de fêmeas coletadas diariamente e temperaturas máxima ($r_s = 0,60$; $***p < 0,0001$) e mínima ($r_s = 0,53$; $***p < 0,0001$), respectivamente. Também se verificou correlação negativa entre umidade relativa do ar e número de fêmeas coletadas por dia ($r_s = -0,45$; $**p = 0,001$) (Tabela 6).

TABELA 6: Correlação entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas diariamente e variáveis meteorológicas, nos quatro períodos de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

Par es de variáveis	r_s	p
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e índice pluviométrico	0,22	0,34
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e temperatura máxima	0,60	< 0,0001***
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e temperatura mínima	0,53	< 0,0001***
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e umidade relativa do ar	-0,45	0,001**

r_s – Correlação de Spearman; p – valor de p. Fonte: INMET (2010, 2011, 2012b, 2013, 2014).

4.1.3 Amostras positivas para o Dengue virus por períodos e semanas

4.1.3.1 Primeiro período de coleta

No primeiro período de coleta, foram capturadas 1.504 fêmeas de *Ae. aegypti*, que foram divididas em 958 pools, e deste total, 53 (5,53%) foram positivos para o DENV. A semana 13 (março de 2011) foi a de maior número de pools formados, com 74 (7,83%), no entanto na semana 14 (abril de 2011), verificou-se o maior número de pools positivos para o vírus, com 34 (64,18%) (Gráfico 7).

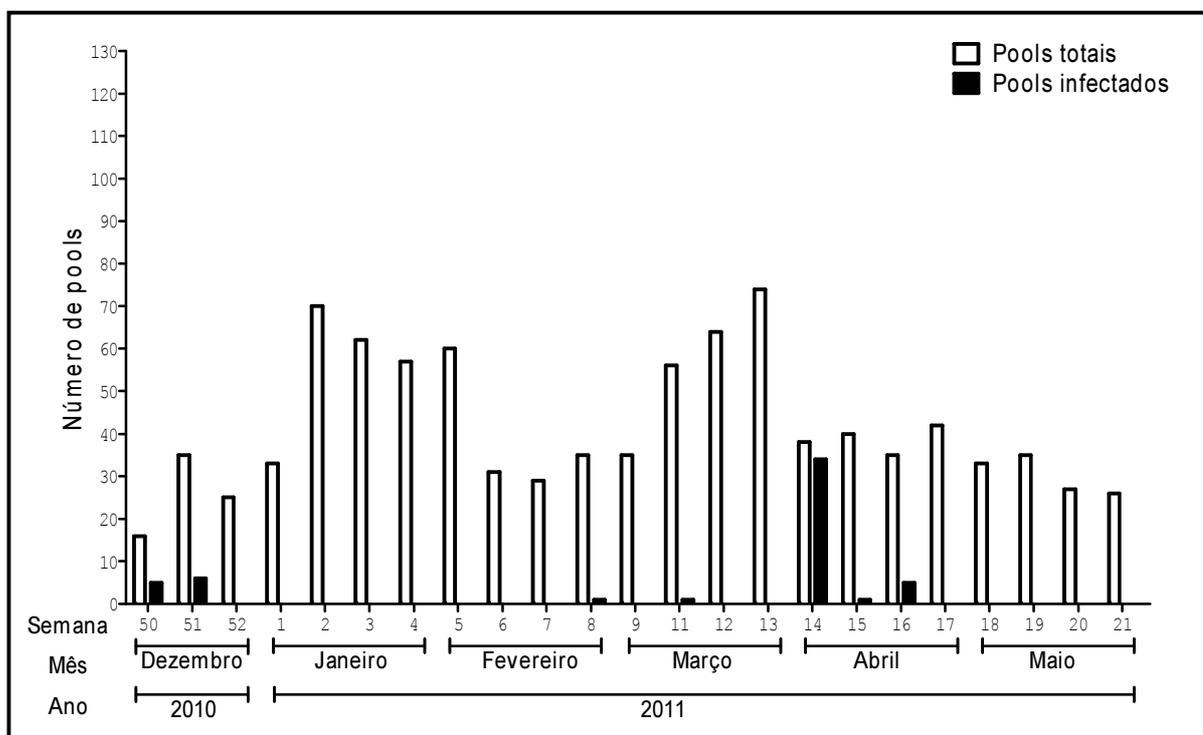


GRÁFICO 7: Número de pools de fêmeas de *Ae. aegypti* totais e número de pools infectados pelo Dengue virus por semana, no primeiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.1.3.2 Segundo período de coleta

Em relação ao segundo período de capturas, foram coletadas 2.516 fêmeas de *Ae. aegypti*, divididas em 1.403 pools, e destes, 86 (6,12%) foram positivos para o DENV. No que diz respeito à semana de maior número de pools formados, na semana 3 (janeiro de 2012), obteve-se 87 (6,37%). A semana 52 (dezembro de 2011), por sua vez, foi a de maior positividade de pools do mosquito, com 27 (31,43%) (Gráfico 8).

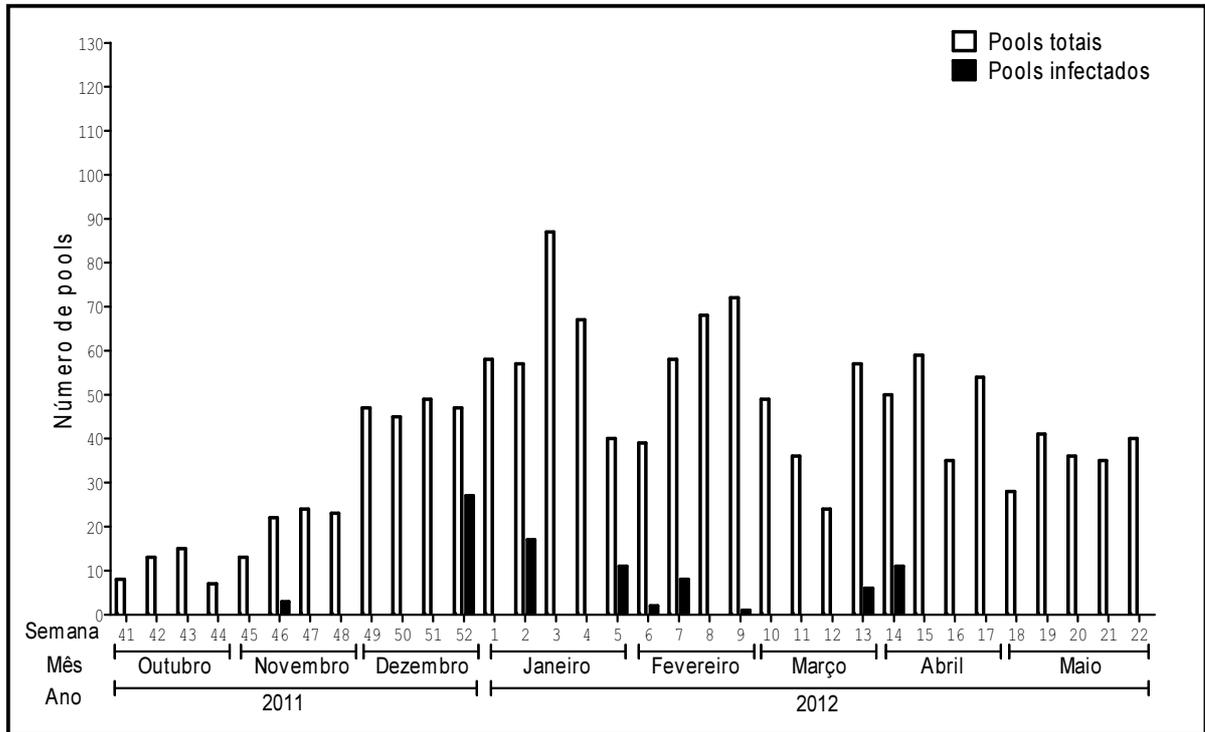


GRÁFICO 8: Número de pools de fêmeas de *Ae. aegypti* totais e número de pools infectados pelo Dengue vírus por semana, no segundo período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.1.3.3 Terceiro período de coleta

No terceiro período de coleta, houve a captura de 3.728 exemplares fêmeas de *Ae. aegypti*, com a formação de 1.818 pools, e destes, 164 (9,01%) pools foram positivos para o DENV. Na semana 8 (fevereiro de 2013) houve o maior número de pools formados, com 90 (5,15%) e na semana 21 (maio de 2013) o maior número de positivos para o vírus, com 20 (12,44%) (Gráfico 9).

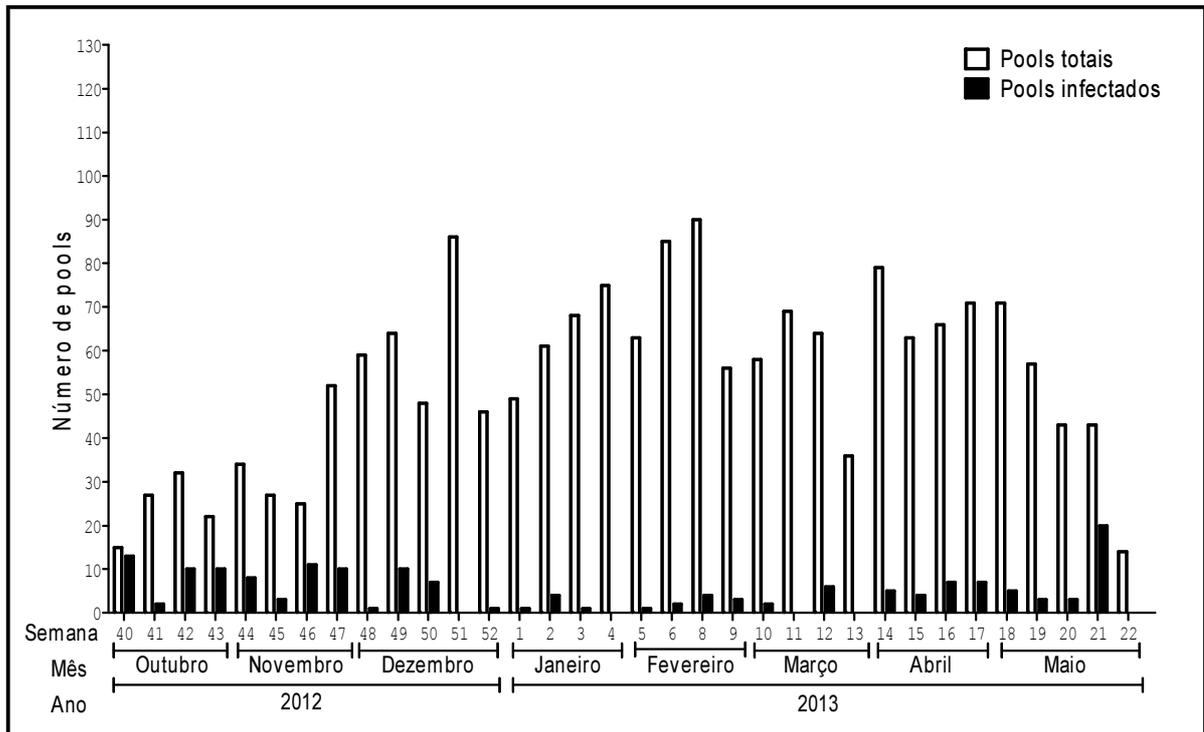


GRÁFICO 9: Número de pools de fêmeas de *Ae. aegypti* totais e número de pools infectados pelo Dengue vírus por semana, no terceiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.1.3.4 Quarto período de coleta

Quanto ao quarto período de capturas, foram coletadas 2.914 fêmeas de *Ae. aegypti*, divididas em 1.877 pools, dos quais 40 (2,13%) foram positivos para o vírus. No que diz respeito à semana de maior número de pools formados, na semana 15 (abril de 2014), obteve-se 124 (6,60%). A semana 14 (abril de 2014), por sua vez, foi a de maior positividade de pools do mosquito, com 28 (70,0%) (Gráfico 10).

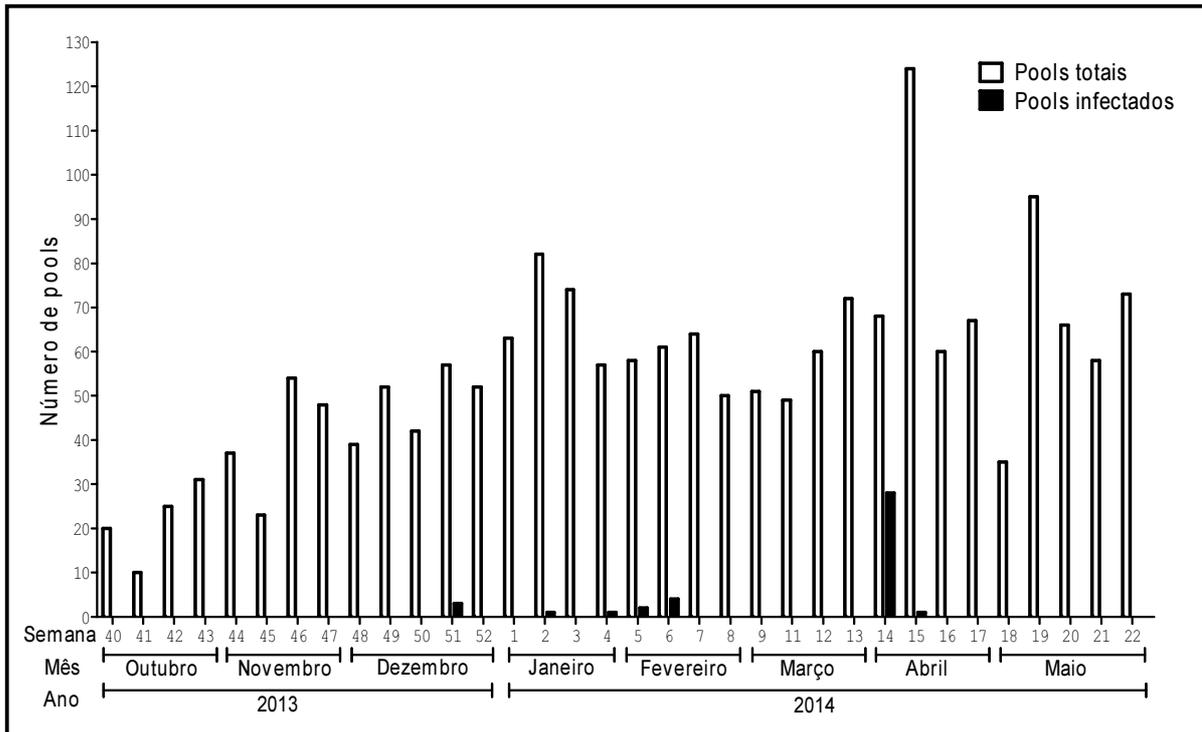


GRÁFICO 10: Número de pools de fêmeas de *Ae. aegypti* totais e número de pools infectados pelo Dengue vírus por semana, no quarto período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.1.3.5 Distritos Sanitários

Nos quatro períodos de estudo, dos 343 pools de *Ae. aegypti* positivos para o DENV, 126 (36,73%) foram encontrados no DS Pampulha, 134 (39,06%) no DS Norte e 83 (24,19%) no DS Leste. Em relação aos períodos de coleta, o DS Pampulha obteve os maiores percentuais de pools positivos para o DENV, no primeiro (45,29%), segundo (41,87%) e quarto (40,00%) períodos; e o DS Norte, no terceiro período, com 47,57% de positividade (Tabela 7).

TABELA 7: Número e porcentagem de pools de *Ae. aegypti* positivos para o Dengue vírus, nos quatro períodos de coleta e nos três Distritos Sanitários em estudo.

Período	Distrito Sanitário			Total N (%)
	Pampulha N (%)	Norte N (%)	Leste N (%)	
1º	24 (45,29)	15 (28,30)	14 (26,41)	53 (100,00)
2º	36 (41,87)	30 (34,88)	20 (23,25)	86 (100,00)
3º	50 (30,48)	78 (47,57)	36 (21,95)	164 (100,00)
4º	16 (40,00)	11 (27,50)	13 (32,50)	40 (100,00)
Total	126 (36,73)	134 (39,08)	83 (24,19)	343 (100,00)

N – número de pools positivos; % – porcentagem de pools positivos.

4.1.4 Amostras positivas para o Dengue virus e ocorrência de casos de dengue nos Distritos Sanitários

4.1.4.1 Primeiro período de coleta

No primeiro período de estudo, foram notificados 2.022 casos de dengue nos três DS (Tabela 8). Observou-se que a semana de maior número de pools positivos do culicídeo foi a 14 (abril de 2011) com 34 (64,15%). No entanto, a de maior número de notificações da doença em seres humanos foi a semana 12 (março de 2011), com 168 (8,49%) registros (Gráfico 11).

TABELA 8: Número e porcentagem de casos de dengue, por período de coleta, registrados nos três Distritos Sanitários em estudo.

Período	Distrito Sanitário			Total N (%)
	Pampulha N (%)	Norte N (%)	Leste N (%)	
1º	444 (21,95)	924 (45,71)	654 (32,34)	2.022 (100,00)
2º	578 (29,85)	784 (40,51)	574 (29,64)	1.936 (100,00)
3º	10.405 (24,69)	19.307 (45,83)	12.423 (29,48)	42.135 (100,00)
4º	857 (30,94)	903 (32,61)	1.009 (36,45)	2.769 (100,00)
Total	12.284 (25,14)	21.918 (44,86)	14.660 (30,00)	48.862 (100,00)

N – número de casos de dengue; % – porcentagem de casos de dengue. Fonte: PBH (2010, 2011, 2012a, 2013, 2014).

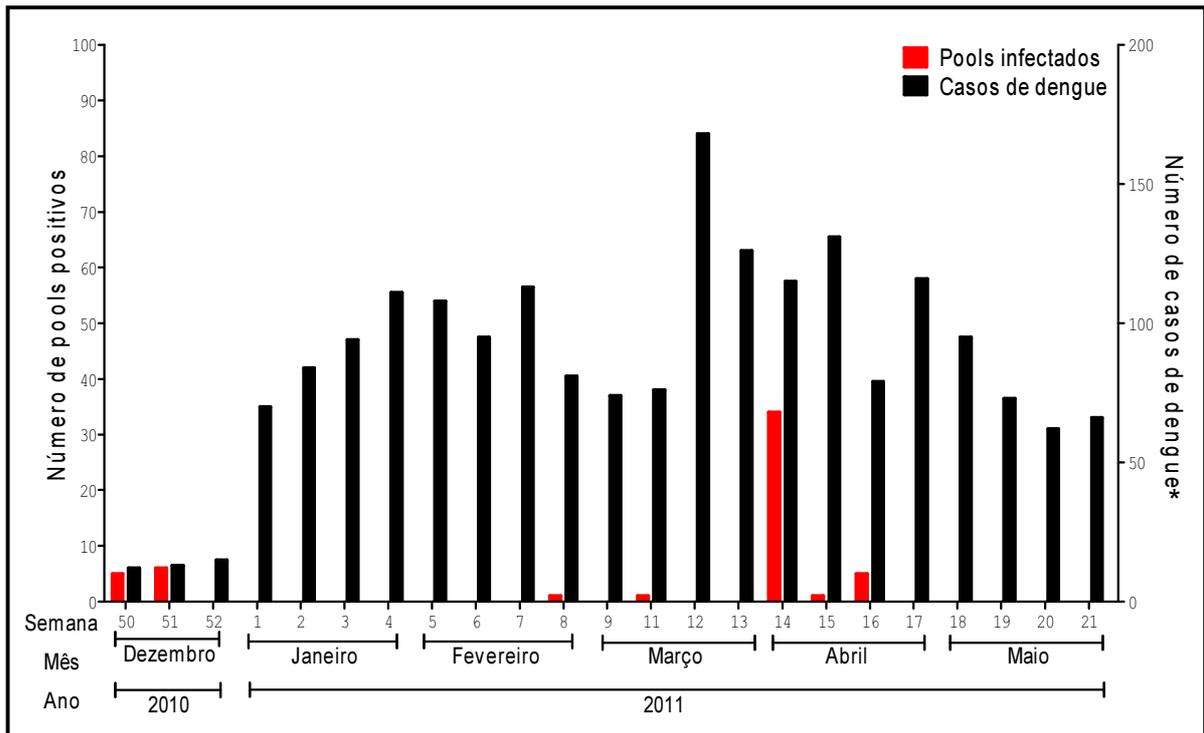


GRÁFICO 11: Número de pools infectados de *Ae. aegypti* pelo Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no primeiro período.

Fonte: PBH (2010, 2011)*.

4.1.4.2 Segundo período de coleta

Em relação ao segundo período de coleta, a SMS revelou a ocorrência de 1.936 casos de dengue nos três DS (Tabela 8). Na semana 52 (dezembro de 2011), obteve-se o maior número de pools positivos para o DENV, com 27 (31,39%), entretanto, o maior registro de casos da doença em seres humanos com 108 (5,58%) notificações ocorreu na semana 3 (janeiro de 2012) (Gráfico 12).

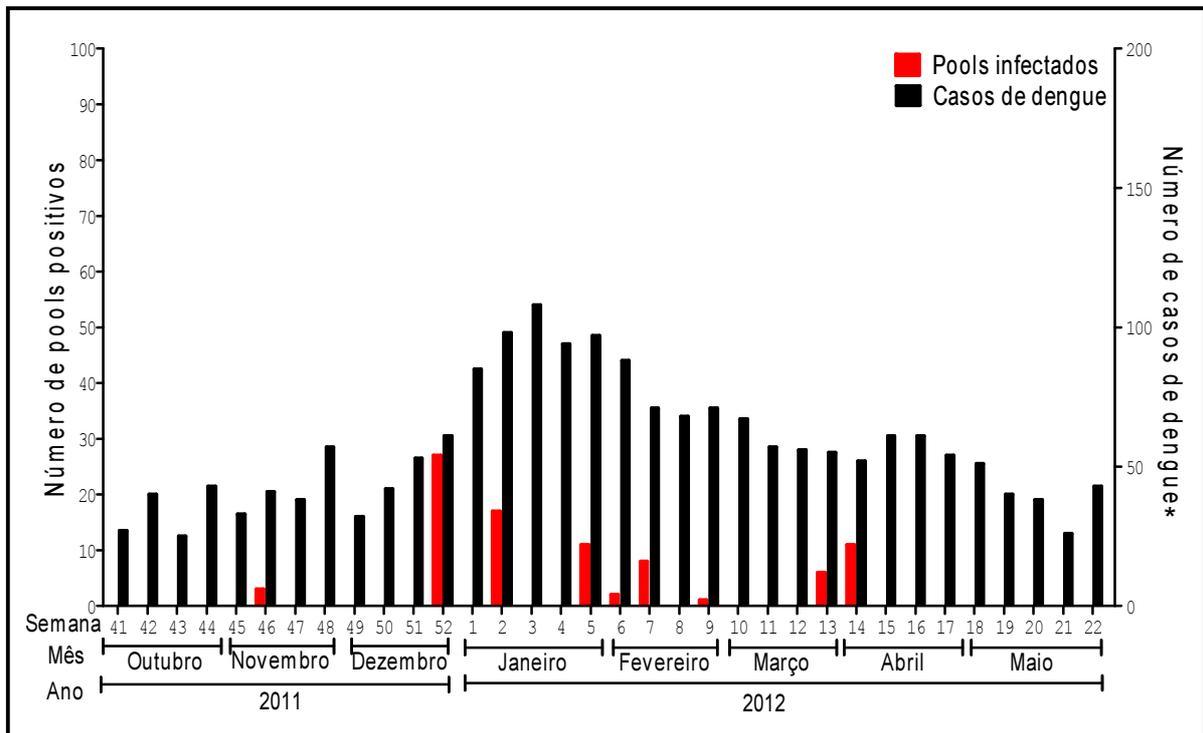


GRÁFICO 12: Número de pools infectados de *Ae. aegypti* pelo Dengue vírus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no segundo período.
Fonte: PBH (2011, 2012a)*.

4.1.4.3 Terceiro período de coleta

No terceiro período de capturas, o número de casos da doença nas regiões em estudo aumentou para 42.135 registros (Tabela 8). A semana 21 (maio de 2013) foi a de maior número de pools positivos do vetor com 20 (12,19%), contudo na semana 14 (abril de 2013), foram registrados 5.139 (13,92%) casos de dengue, o que correspondeu ao maior valor semanal do período (Gráfico 13).

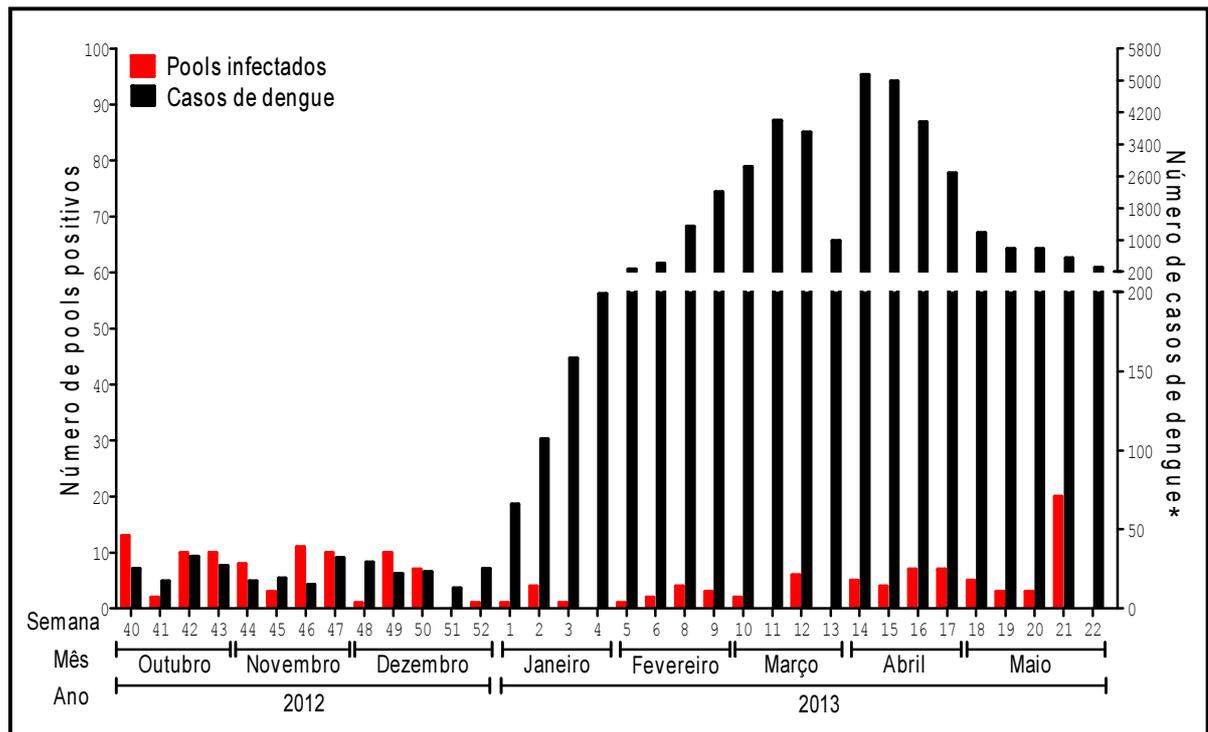


GRÁFICO 13: Número de pools infectados de *Ae. aegypti* pelo Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no terceiro período.

Fonte: PBH (2012a, 2013)*.

4.1.4.4 Quarto período de coleta

Em relação ao quarto período de coleta, a SMS registrou 2.769 casos de dengue nos três DS (Tabela 8). Na semana 14 (abril de 2014), obteve-se o maior número de pools positivos para o DENV, com 28 (70,0%). Porém, as maiores notificações de casos da doença em seres humanos, com 175 (6,30%), ocorreram na semana 7 (fevereiro de 2014) (Gráfico 14).

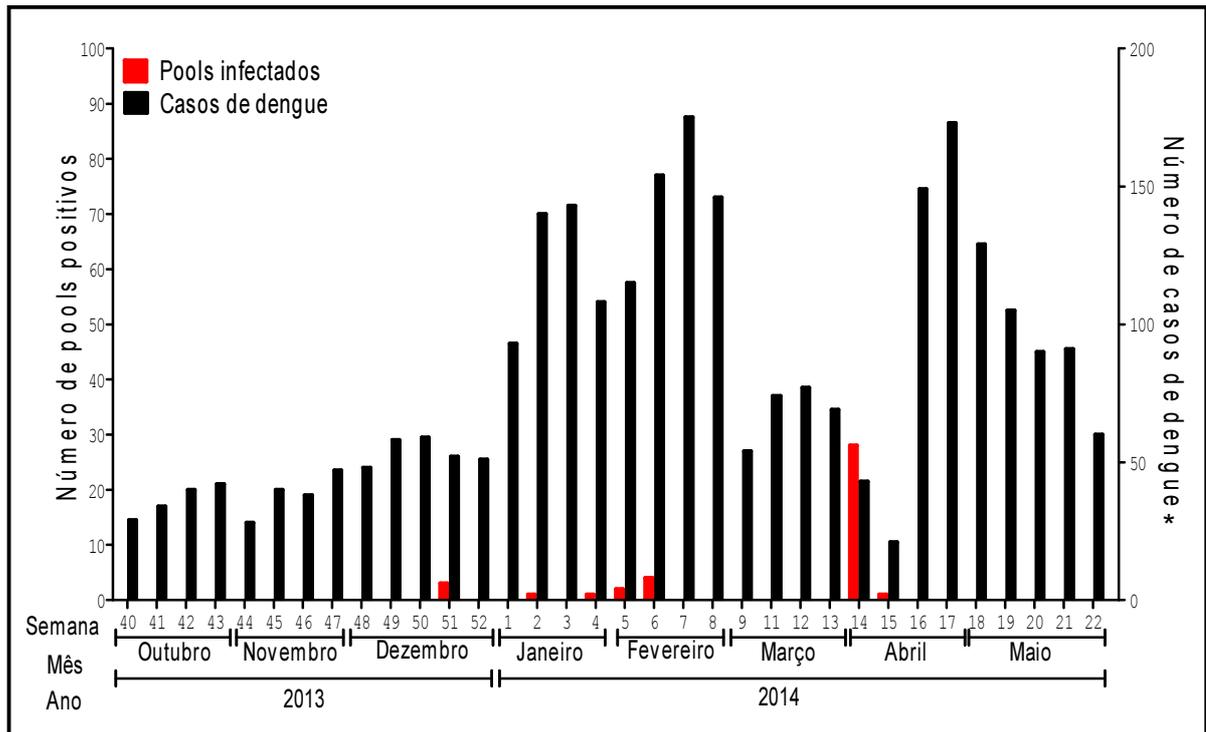


GRÁFICO 14: Número de pools infectados de *Ae. aegypti* pelo Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no quarto período.

Fonte: PBH (2013, 2014)*.

4.2 Aedes albopictus

4.2.1 Captura de culicídeos

Nos quatro períodos de estudo, foram coletadas 511 fêmeas de *Ae. albopictus*, sendo 117 (22,89%) no primeiro, 44 (8,61%) no segundo, 199 (38,96%) no terceiro e 151 (29,54%) no quarto período (Gráfico 15A). Em relação aos DS de coleta, foram capturadas 234 (45,80%) fêmeas de *Ae. albopictus* no DS Pampulha, 99 (19,37%) no DS Norte e 178 (34,83%) no DS Leste (Gráfico 15B).

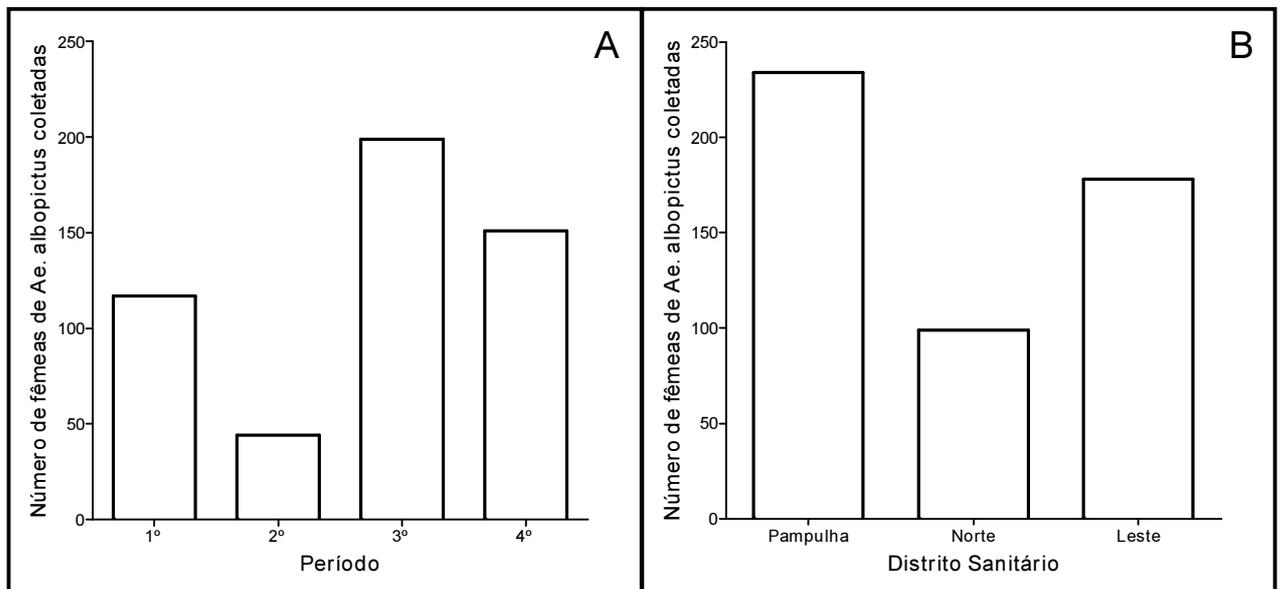


GRÁFICO 15: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas em todo o estudo. (A) Distribuição de exemplares por período de coleta. (B) Distribuição de exemplares por Distrito Sanitário.

Houve diferença estatisticamente significativa na comparação das medianas de mosquitos coletados entre os períodos ($H = 30,36$; $***p < 0,0001$) e entre os DS ($H = 20,16$; $***p < 0,0001$), pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas de mosquitos do primeiro ($***p < 0,0001$), do terceiro ($***p < 0,0001$) e do quarto ($***p < 0,0001$) períodos foram significativamente maiores que a do segundo, pelo teste de Dunn (Gráfico 16A); e as medianas de mosquitos coletados no DS Pampulha ($***p < 0,0001$) e no DS Leste ($*p < 0,05$) foram significativamente maiores que a do DS Norte (Gráfico 16B).

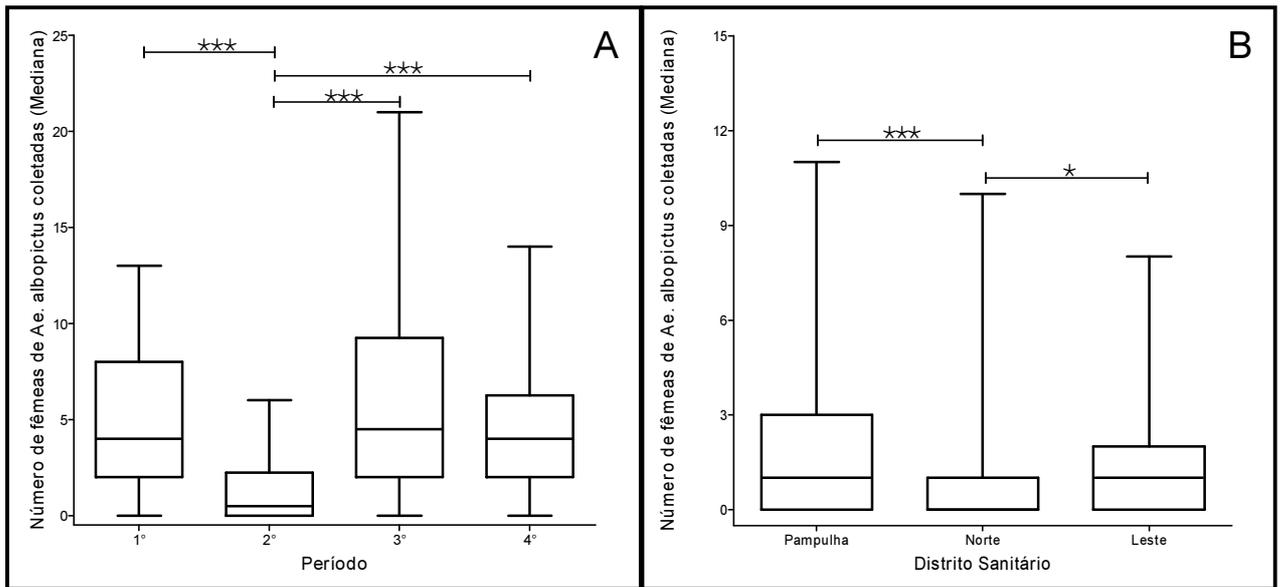


GRÁFICO 16: Comparação entre medianas referentes às fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas em todo o estudo. (A) Comparação entre os períodos de coleta. (B) Comparação entre os Distritos Sanitários. *** $p < 0,0001$.

4.2.1.1 Primeiro período de coleta

A semana 51 (dezembro de 2010) foi a que apresentou o maior número de exemplares, totalizando 13 (11,11%). Não foram capturados exemplares nas semanas 20 e 21 (maio de 2011). O maior volume de chuvas foi registrado na semana 1 (janeiro de 2011), com 168,5 mm³ (Gráfico 17). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 15°C e 31,4°C, e a umidade relativa do ar, entre 50,90% e 77,60% no período (INMET, 2010; 2011).

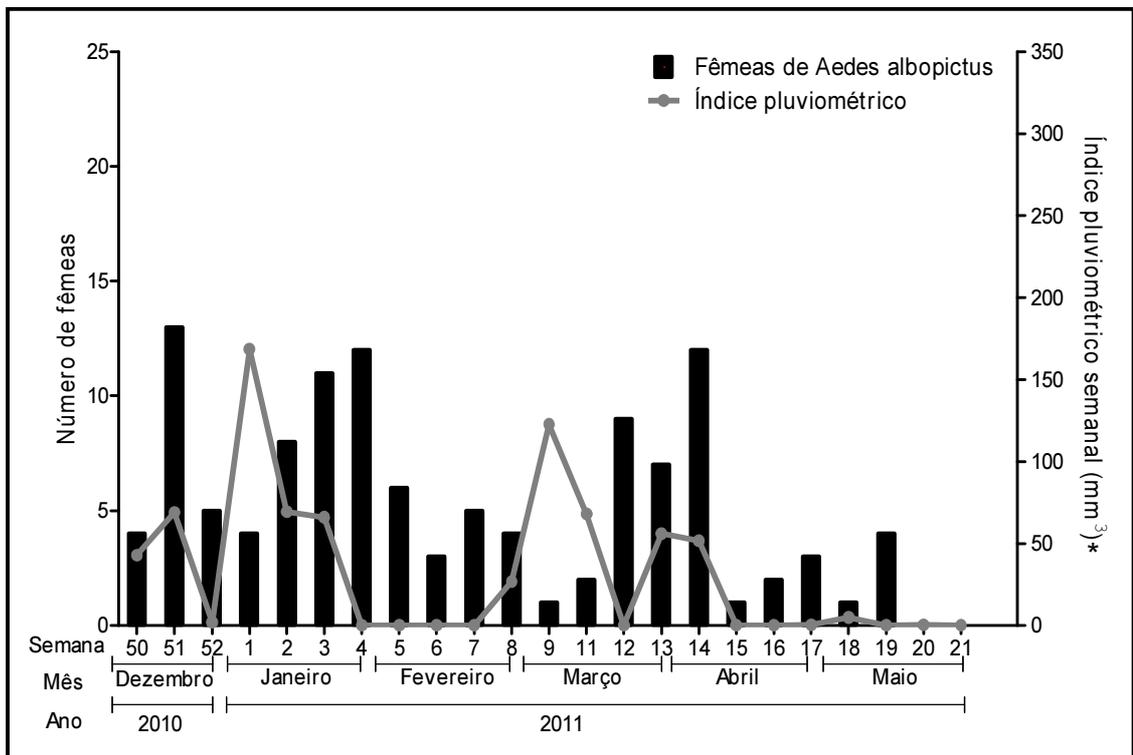


GRÁFICO 17: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e índice pluviométrico semanal, no primeiro período, nos Distritos Sanitários em estudo.

Fonte: INMET (2010, 2011)*.

4.2.1.2 Segundo período de coleta

A semana 17 (abril de 2012) foi a que obteve o maior número de exemplares deste período, com seis mosquitos (13,63%). Em várias semanas referentes a diferentes meses, não houve capturas: 41, 42, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 2, 7, 8, 9, 11, 20, 21 e 22, o que caracterizou este como o período de menor número de espécimes coletados. Verificou-se que o maior valor acumulado de chuvas foi notificado na semana 50 (dezembro de 2011), com 307,5 mm³ (Gráfico 18). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 15,4°C e

31,7°C, e a umidade relativa do ar variou de 45,10% a 83,60% no período (INMET, 2011; 2012b).

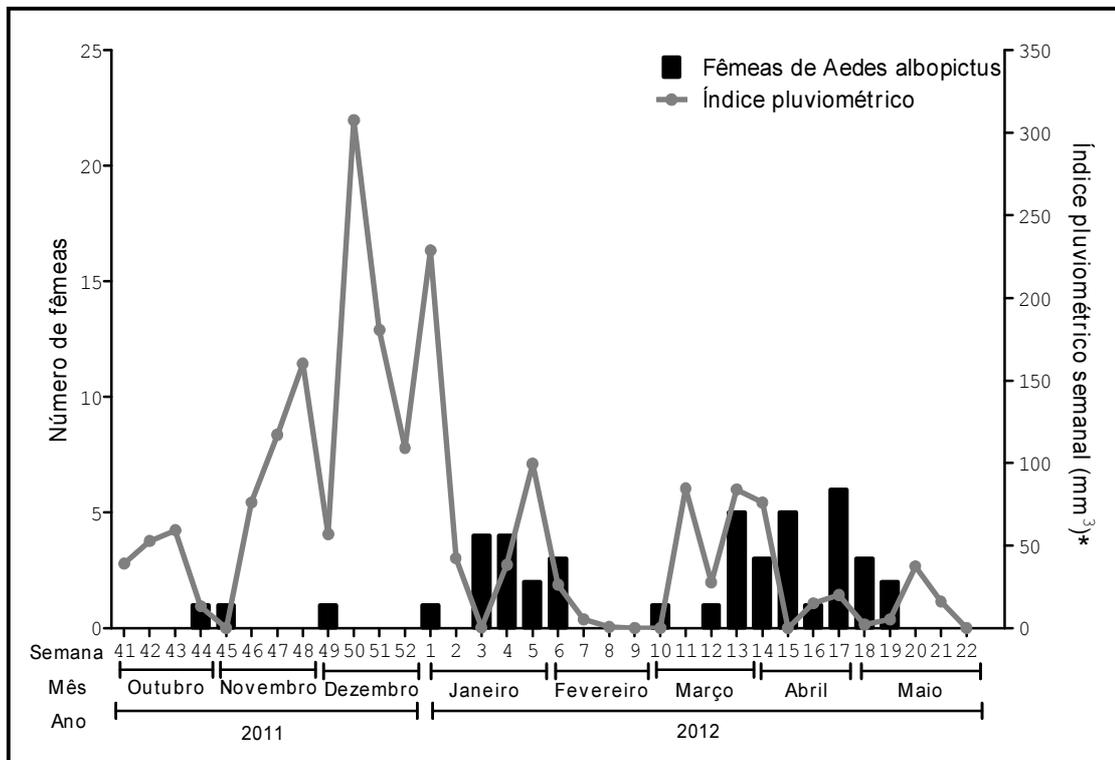


GRÁFICO 18: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e índice pluviométrico semanal, no segundo período, nos Distritos Sanitários em estudo.

Fonte: INMET (2011, 2012b)*.

4.2.1.3 Terceiro período de coleta

Na semana 6 (fevereiro de 2013) houve o maior número de mosquitos coletados: 21 mosquitos (10,55%). Não houve captura de espécimes em três semanas: 40 (outubro de 2012), 44 e 46 (novembro de 2012). O maior índice pluviométrico foi registrado na semana 4 (janeiro de 2013), com 159,6mm³ (Gráfico 19). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 14,8°C e 33,4°C, e a umidade relativa do ar, entre 45,50% e 81,20% no período (INMET, 2012b; 2013).

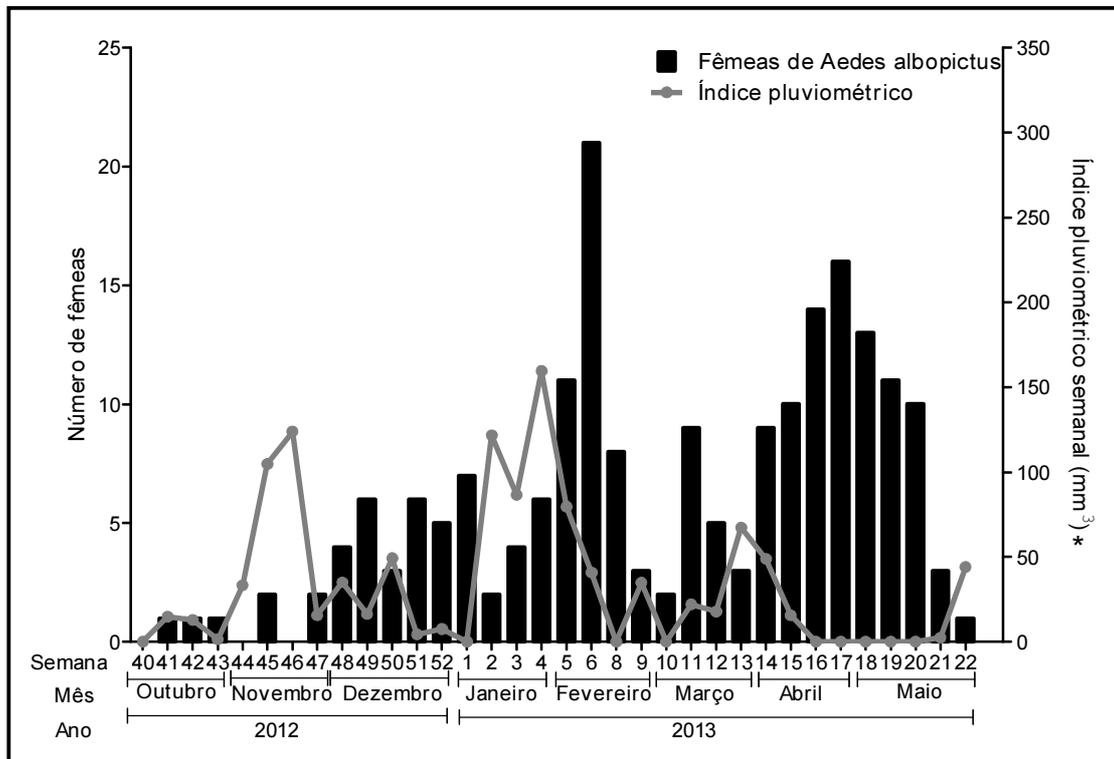


GRÁFICO 19: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e índice pluviométrico semanal, no terceiro período, nos DS em estudo.

Fonte: INMET (2012b, 2013)*.

4.2.1.4 Quarto período de coleta

Na semana 2 (janeiro de 2014) houve o maior número de mosquitos coletados, com 14 espécimes (9,27%). Nas semanas 40 e 42 (outubro de 2013), e 17 (abril de 2014), não houve capturas. O maior índice pluviométrico foi registrado na semana 51 (dezembro de 2013), com 265,6mm³ (Gráfico 20). As temperaturas médias semanais tiveram variação entre 14,8°C e 32,8°C, e a umidade relativa do ar variou de 51,70% a 80,00% no período (INMET, 2013; 2014).

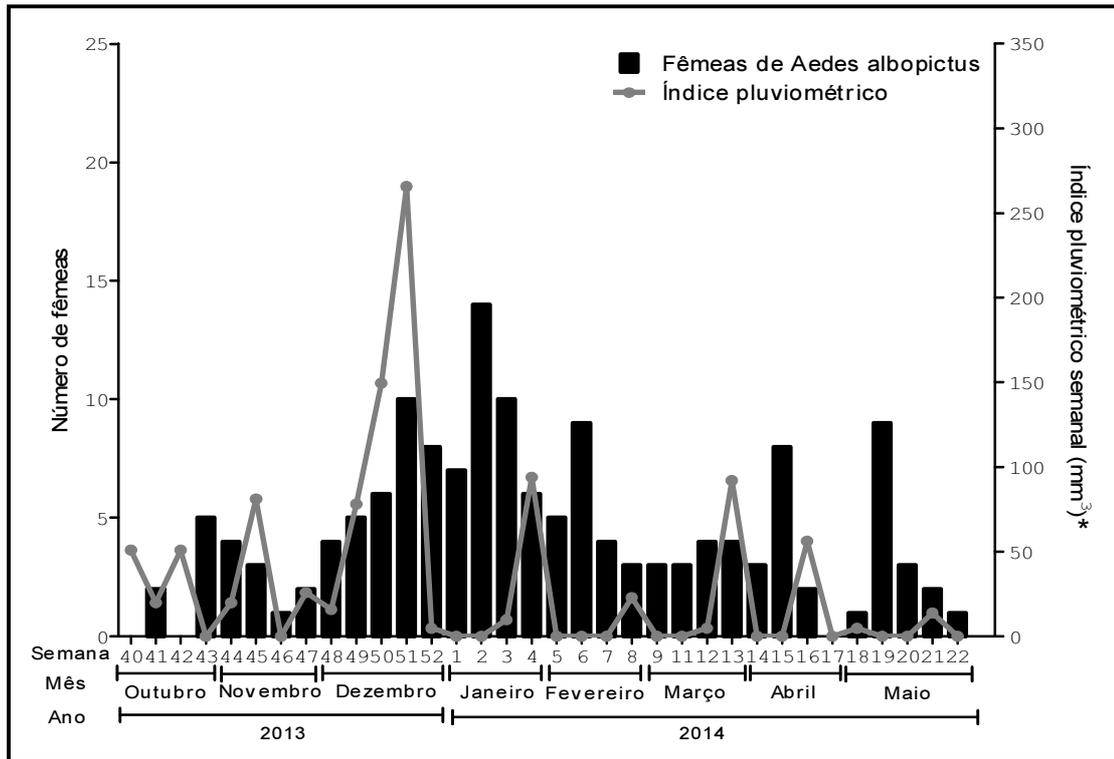


GRÁFICO 20: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e índice pluviométrico semanal, no quarto período, nos Distritos Sanitários em estudo.

Fonte: INMET (2013, 2014)*.

4.2.2 Correlação entre número de fêmeas de *Aedes albopictus* e fatores climáticos considerando todo o período de estudo

Não houve associação entre pluviosidade e número de espécimes de *Ae. albopictus* coletados, considerando-se todo o período de estudo. No entanto, houve correlação positiva entre quantidade de fêmeas coletadas diariamente e temperaturas máxima ($r_s = 0,25$; $**p = 0,004$) e mínima ($r_s = 0,34$; $***p < 0,0001$), respectivamente. Não se verificou correlação entre umidade relativa do ar e número de fêmeas coletadas por dia (Tabela 9).

Tabela 9: Correlação entre número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas diariamente e variáveis meteorológicas, nos quatro períodos de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

Par es de variáveis	r_s	p
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e índice pluviométrico	- 0,17	0,06
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e temperatura máxima	0,25	0,004**
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e temperatura mínima	0,34	< 0,0001***
Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e umidade relativa do ar	- 0,13	0,15

r_s – Correlação de Spearman; p – valor de p . Fonte: INMET (2010, 2011, 2012b, 2013, 2014).

4.2.3 Amostras positivas para o Dengue virus por períodos e semanas

4.2.3.1 Primeiro período de coleta

No primeiro período de coleta, foram capturadas 117 fêmeas de *Ae. albopictus*, e destas, 26 (22,22%) foram positivas para o DENV. A semana 51 (dezembro de 2010) foi a de maior número de fêmeas capturadas, com 13 (11,23%). A semana 14 (abril de 2011) apresentou o maior número de espécimes positivos para o vírus, com 10 (38,52%) (Gráfico 21).

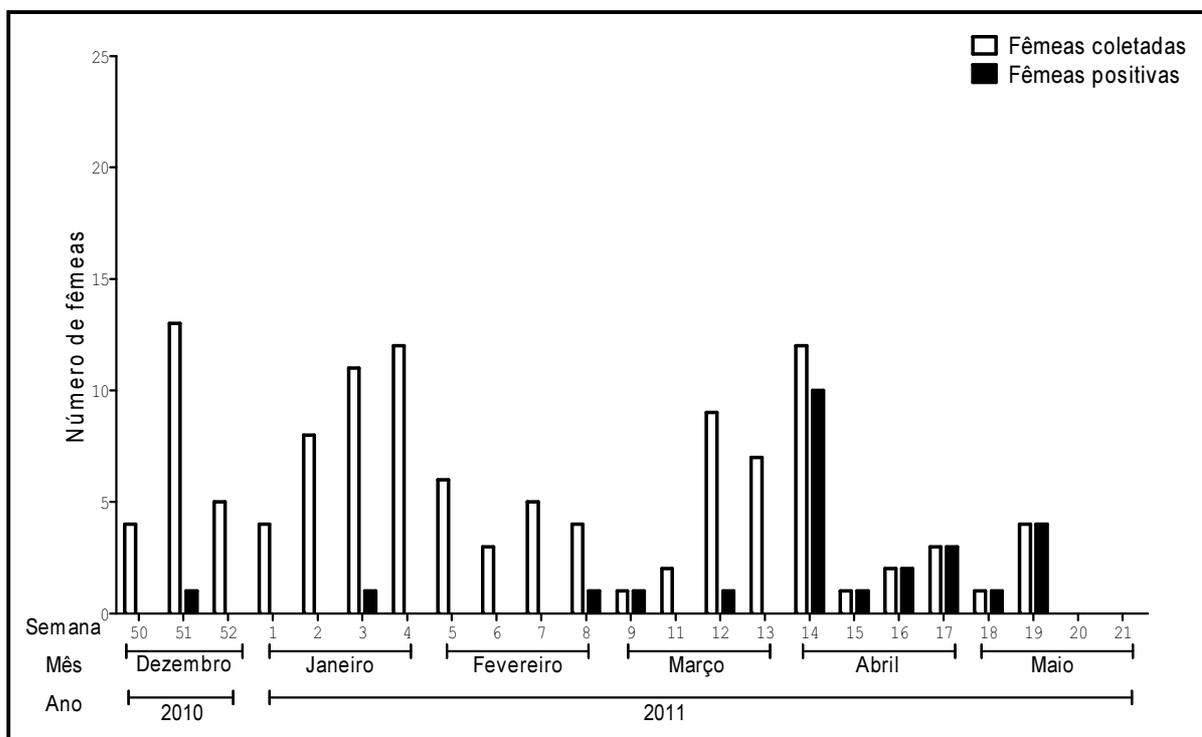


GRÁFICO 21: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue virus por semana, no primeiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.2.3.2 Segundo período de coleta

Quanto ao segundo período de capturas, foram coletadas 44 fêmeas de *Ae. albopictus*, e destas, 37 (84,09%) foram positivas para o vírus. A semana de maior número de capturas foi a 17 (abril de 2012) com seis (13,70%) fêmeas. No entanto, na semana 15 (abril de 2012), foi encontrado o maior número de indivíduos positivos com cinco (13,58%) (Gráfico 22).

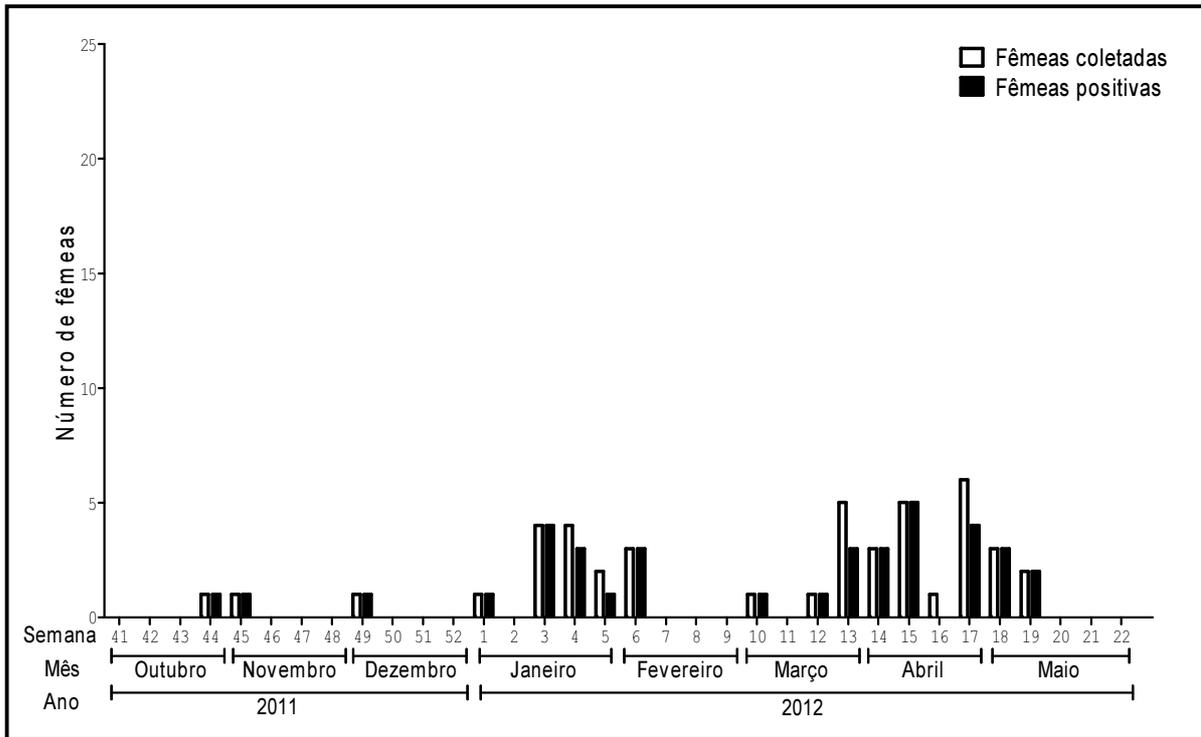


GRÁFICO 22: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue vírus por semana, no segundo período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.2.3.3 Terceiro período de coleta

No terceiro período de coleta, foram capturados 199 exemplares de *Ae. albopictus*, e 11 (5,54%) foram positivos para o DENV. Na semana 6 (fevereiro de 2013) houve o maior número de capturas, com 21 (10,55%) fêmeas. Nas semanas 1 (janeiro de 2013) e 16 (abril de 2013), obteve-se o maior número de amostras positivas para o vírus, correspondente a três (27,27%) indivíduos em cada (Gráfico 23).

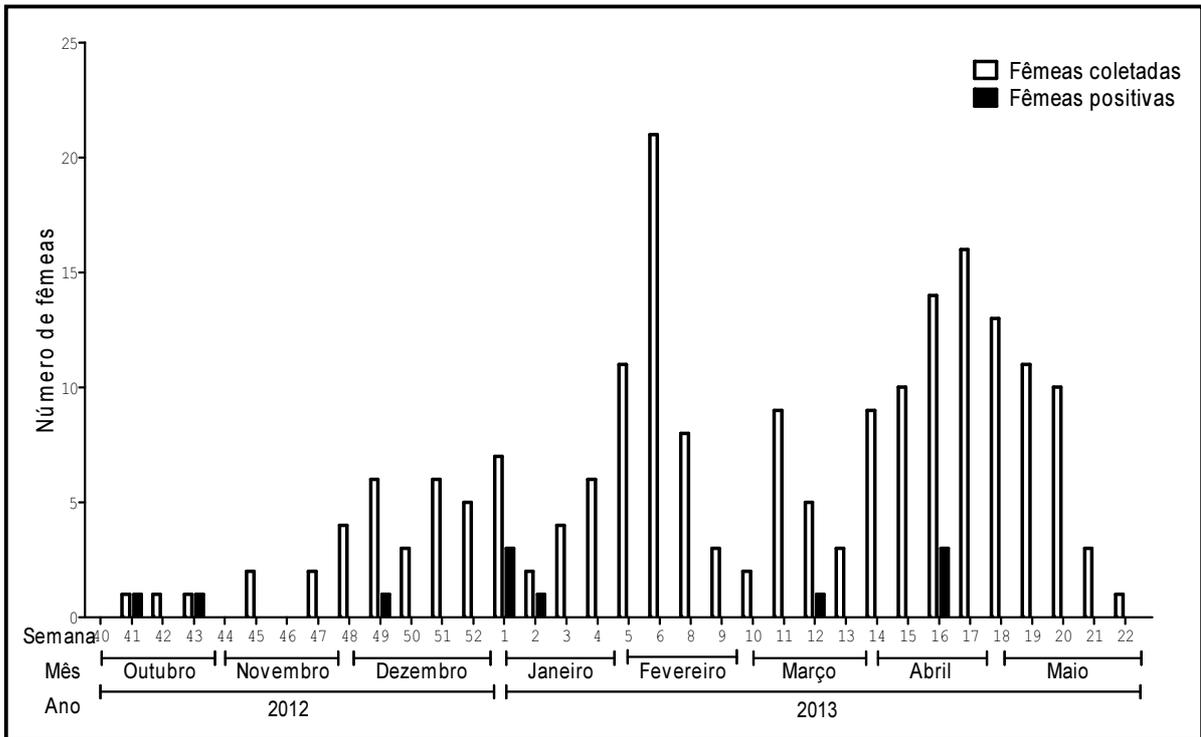


GRÁFICO 23: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue vírus por semana, no terceiro período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.2.3.4 Quarto período de coleta

Em relação ao quarto período de capturas, foram coletadas 151 fêmeas de *Ae. albopictus*, e destas, cinco (3,31%) foram positivas para o vírus. O maior número de fêmeas capturadas foi registrado na semana 2 (janeiro de 2014) com 14 (9,27%) indivíduos. No entanto, somente na semana 14 (abril de 2014), encontrou-se o maior número de espécimes positivos, com dois (40,00%) (Gráfico 24).

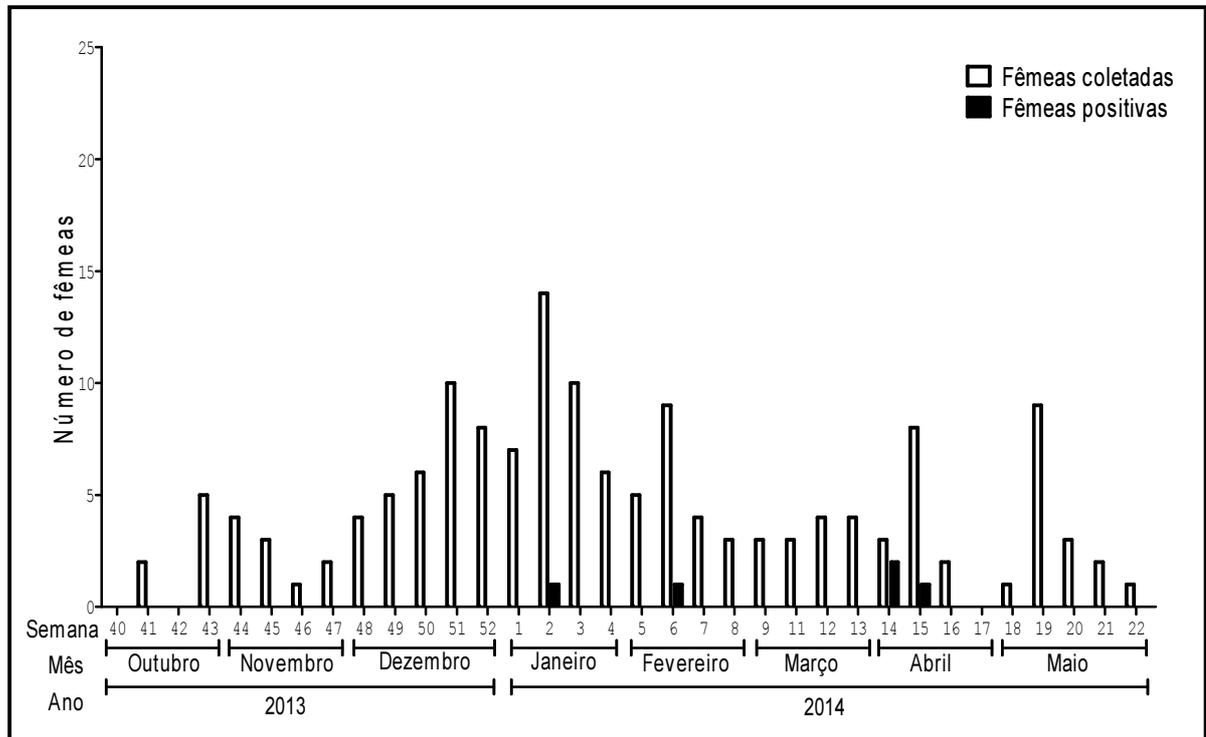


GRÁFICO 24: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas e número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue vírus por semana, no quarto período de coleta nos Distritos Sanitários em estudo.

4.2.3.5 Distritos Sanitários

Nos quatro períodos de estudo, das 79 fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o DENV, 33 (41,79%) foram encontrados no DS Pampulha, 24 (30,37%) no DS Norte e 22 (27,84%) no DS Leste (Tabela 10). No DS Pampulha foram registrados os maiores percentuais de fêmeas positivas para o vírus no primeiro (53,86%) e segundo (40,56%) períodos. Norte e Leste obtiveram o mesmo percentual de amostras positivas no terceiro período, com 36,36% em cada DS. Já no quarto período, o DS Leste foi o de maior percentual de exemplares positivos no quarto período, com 80,00% (Tabela 10).

TABELA 10: Número e porcentagem de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue vírus, nos quatro períodos de coleta e nos três Distritos Sanitários em estudo.

Período	Distrito Sanitário			Total N (%)
	Pampulha N (%)	Norte N (%)	Leste N (%)	
1º	14 (53,86)	9 (34,61)	3 (11,53)	26 (100,00)
2º	15 (40,56)	11 (29,72)	11 (29,72)	37 (100,00)
3º	3 (27,28)	4 (36,36)	4 (36,36)	11 (100,00)
4º	1 (20,00)	0 (0,00)	4 (80,00)	5 (100,00)
Total	33 (41,79)	24 (30,37)	22 (27,84)	79 (100,00)

N – número de fêmeas positivas; % – porcentagem de fêmeas positivas.

4.2.4 Amostras positivas para o Dengue virus e ocorrência de casos de dengue nos Distritos Sanitários

4.2.4.1 Primeiro período de coleta

No primeiro período de estudo, houve o registro de 2.022 casos de dengue notificados nos três DS. A semana de maior número de exemplares positivos foi a 14 (abril de 2011) com 10 (38,46%), entretanto, a de maior número de notificações da doença em seres humanos foi a semana 12 (março de 2011), com 168 (8,49%) registros (Gráfico 25).

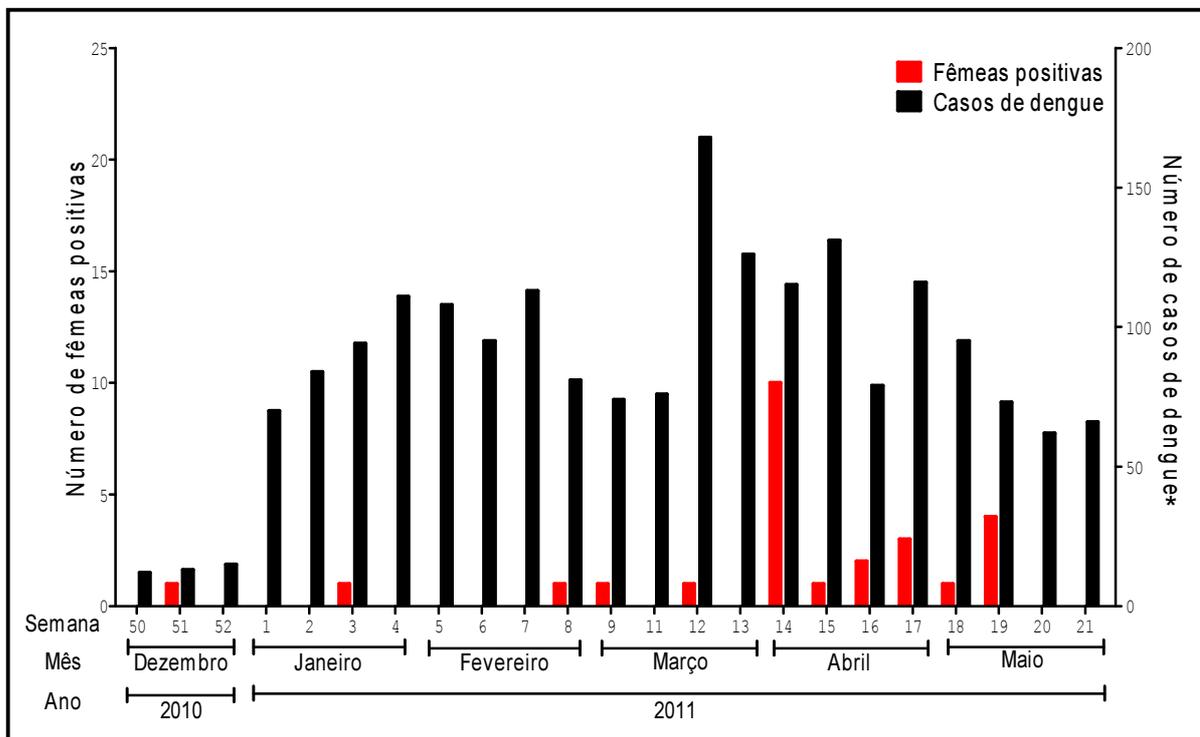


GRÁFICO 25: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue virus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no primeiro período.

Fonte: PBH (2010, 2011)*.

4.2.4.2 Segundo período de coleta

Quanto ao segundo período de capturas, os três distritos tiveram o registro de 1.936 casos de dengue. A semana 15 (abril de 2012) apresentou o maior número de espécimes positivos, com cinco (13,51%); no entanto, foi a semana 3 (janeiro de 2012), a de maior registro de casos da doença em seres humanos com 108 (5,58%) notificações (Gráfico 26).

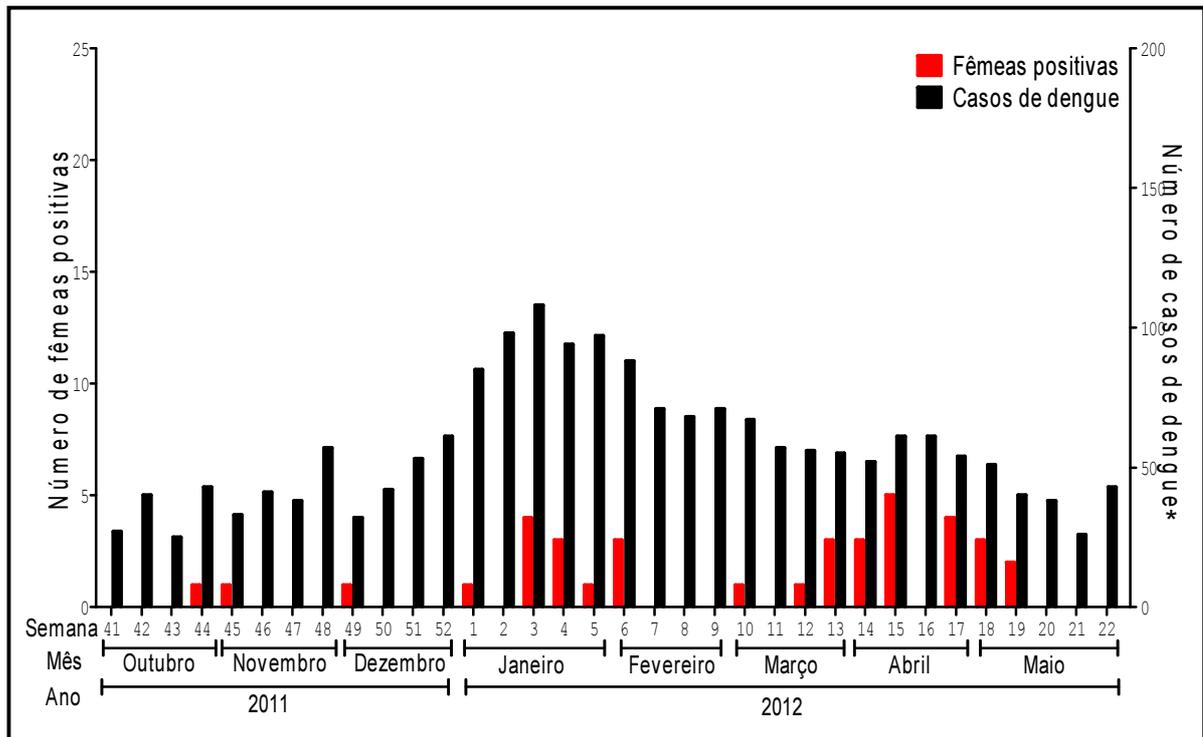


GRÁFICO 26: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue vírus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no segundo período.
Fonte: PBH (2011, 2012a)*.

4.2.4.3 Terceiro período de coleta

No terceiro período de coleta, o número de casos da doença nos DS avaliados correspondeu a 42.135 notificações. As semanas 1 (janeiro de 2013) e 16 (abril de 2013) foram as de maior número de exemplares positivos de *Ae. albopictus* para DENV, com três (27,27%) em cada. Na semana 14 (abril de 2013), 5.139 (13,92%) casos de dengue foram confirmados, correspondente ao maior valor semanal do período (Gráfico 27).

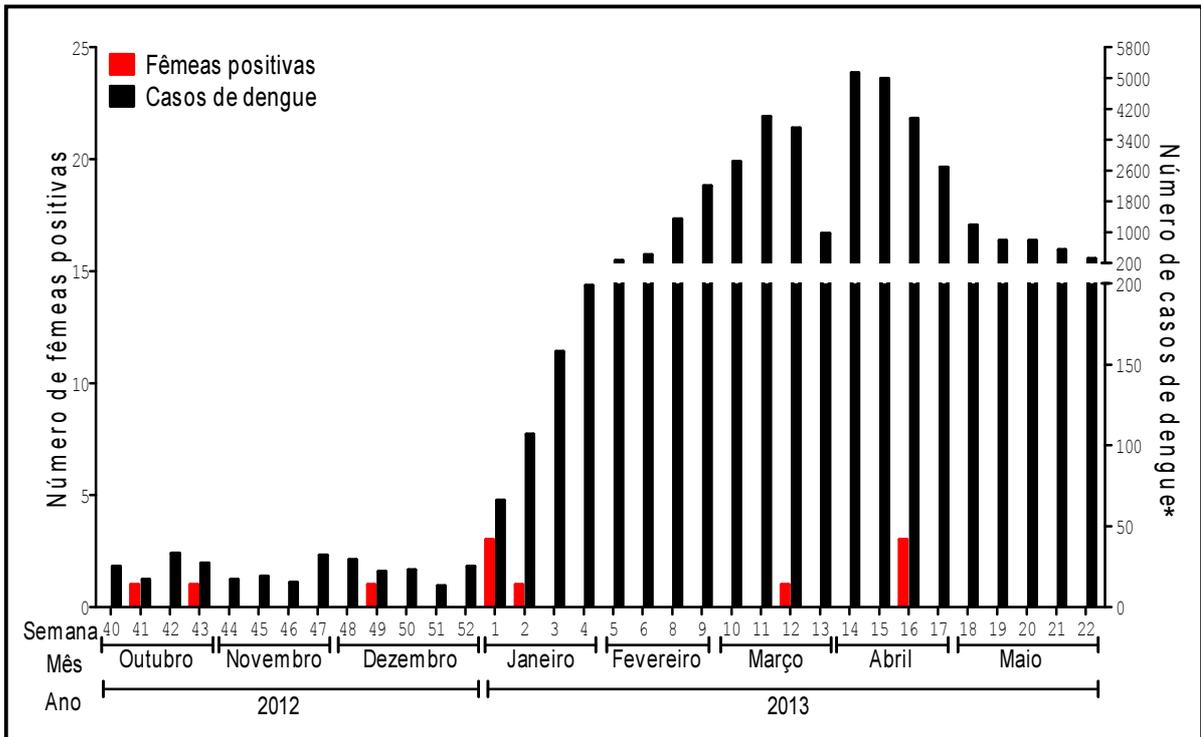


GRÁFICO 27: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue vírus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no terceiro período. Fonte: PBH (2012a, 2013)*.

4.2.4.4 Quarto período de coleta

Em relação ao quarto período de capturas, os três distritos tiveram o registro de 2.769 casos de dengue. Na semana 14 (abril de 2014) registrou-se o maior número de espécimes positivos, com dois (40,00%), mas foi a semana 3 (janeiro de 2014) a de maior registro de casos da doença em seres humanos com 108 (5,58%) notificações (Gráfico 28).

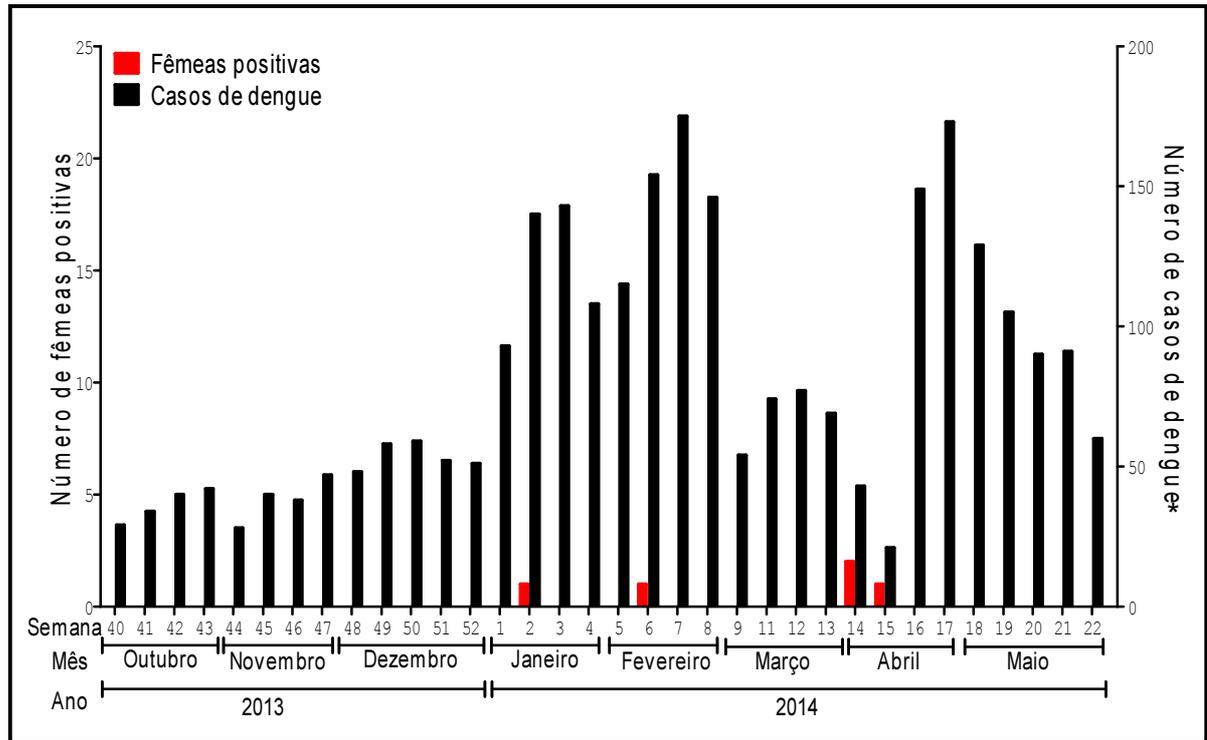


GRÁFICO 28: Número de fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o Dengue vírus e casos de dengue notificados nos Distritos Sanitários Pampulha, Norte e Leste, por semana, no quarto período.
 Fonte: PBH (2013, 2014)*.

4.3 Correlação entre número de fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

Verificou-se correlação positiva entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas semanalmente nos quatro períodos de estudo ($r_s = 0,56$; $*** p < 0,0001$) (Gráfico 29).

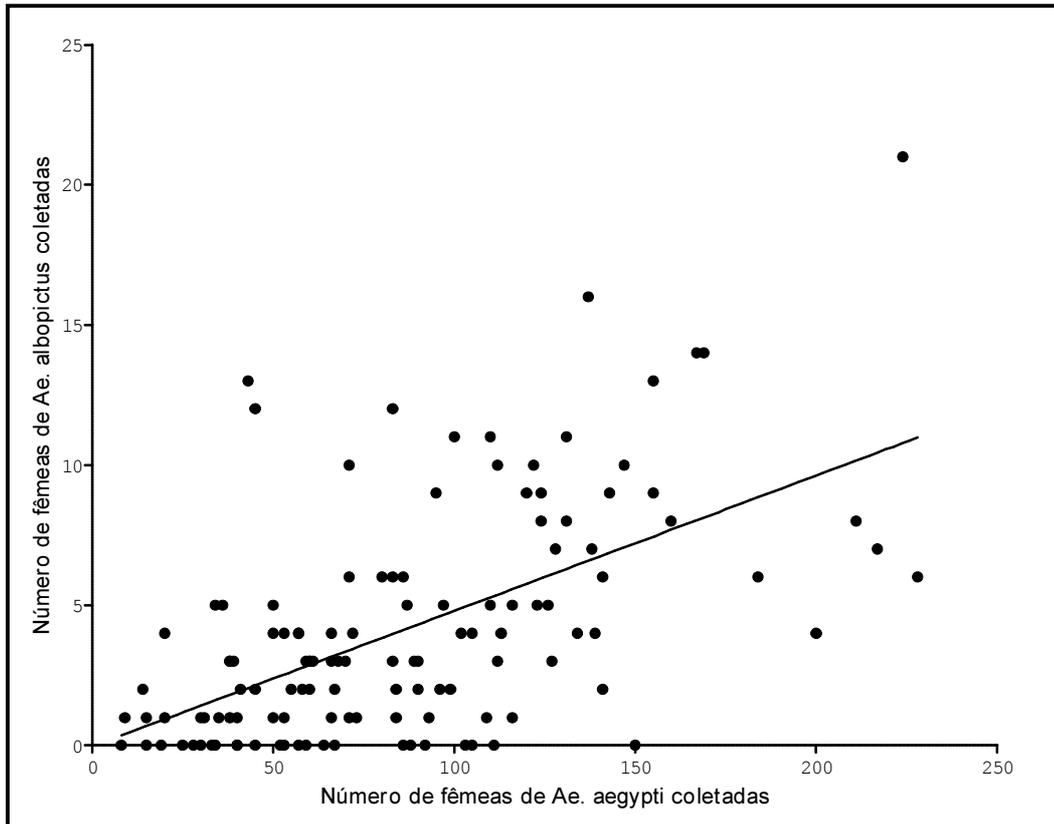


GRÁFICO 29: Correlação entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas nos quatro períodos de estudo.

Em relação aos DS, também se verificou correlação entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas semanalmente: no DS Pampulha ($r_s = 0,37$; $*** p < 0,0001$) (Gráfico 30), no DS Norte ($r_s = 0,42$; $*** p < 0,0001$) (Gráfico 31) e no DS Leste ($r_s = 0,57$; $*** p < 0,0001$) (Gráfico 32), foram observadas correlações positivas entre as duas variáveis.

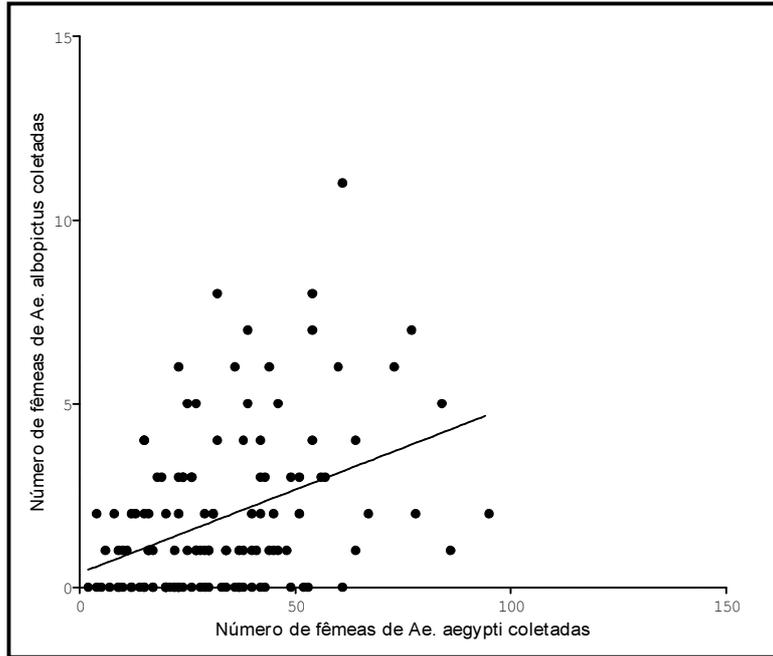


GRÁFICO 30: Correlação entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas nos quatro períodos de estudo, no Distrito Sanitário Pampulha.

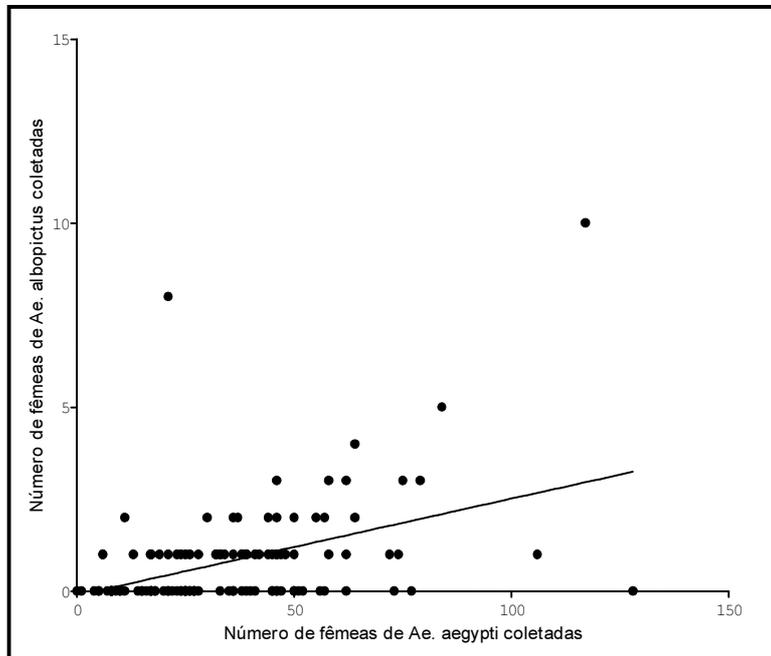


GRÁFICO 31: Correlação entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas nos quatro períodos de estudo, no Distrito Sanitário Norte.

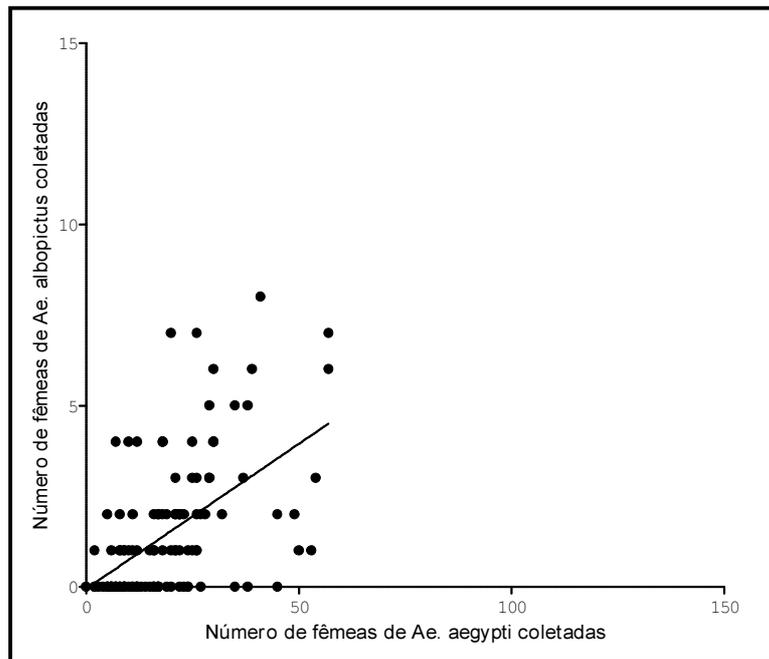


GRÁFICO 32: Correlação entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas nos quatro períodos de estudo, no Distrito Sanitário Leste.

5 DISCUSSÃO

5.1 Captura de culicídeos por períodos e semanas, Distritos Sanitários e fatores climáticos

Os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* têm grande importância em saúde pública. No Brasil o *Ae. aegypti* é responsável pela transmissão de diversas arboviroses destacando-se a dengue e a febre amarela, e mais recentemente, foi o causador de epidemias de febre da Zica e febre Chikungunya em vários estados da federação (MS, 2016). Além dos métodos tradicionais de vigilância das formas imaturas de mosquitos do gênero *Aedes*, voltados para manutenção de índices de infestação do vetor inferiores a 1% (FERREIRA et al., 2009), vários métodos alternativos têm sido investigados. Os métodos alternativos incluem a aspiração mecânica de mosquitos adultos (SCHOELER et al., 2004), a coleta de ovos do mosquito (com a utilização de ovitrampas) (BRAGA et al., 2000), a busca ativa de pupas (MORRISON et al., 2004) e vários tipos de metodologias de captura de mosquitos adultos (a exemplo de armadilhas para adultos com cola, armadilhas mecânicas e armadilhas de atração química) (CHADEE; RITCHIE, 2010; AZIL et al., 2011).

Com a utilização de armadilhas BG-Sentinel Full Version[®] foram capturadas, neste estudo, 10.662 fêmeas de *Ae. aegypti* e 511 fêmeas de *Ae. albopictus*. Pôde-se observar quanto aos períodos de coleta, diferenças estatisticamente significativas nas medianas dos números de exemplares coletados de ambas as espécies (Gráficos 1A, 2A, 15A e 16A). Em relação ao *Ae. aegypti*, o terceiro período de coleta (outubro de 2012 a maio de 2013) foi o de maior número de espécimes coletados em relação ao primeiro (dezembro de 2010 a maio de 2011) e ao segundo (outubro de 2011 a maio de 2012). Para o *Ae. albopictus* o primeiro (dezembro de 2010 a maio de 2011), o terceiro (outubro de 2012 a maio de 2013) e o quarto (outubro de 2013 a maio de 2014) períodos de coleta tiveram medianas superiores a do segundo (outubro de 2011 a maio de 2012).

Essa diferença na quantidade de mosquitos entre os períodos de estudo, relaciona-se provavelmente aos fatores ambientais (variáveis climatológicas). Considerando que determinados tipos de recipientes podem assumir papéis diferenciados na produção de adultos em diferentes regiões, pode-se atribuir aos reservatórios domiciliares como sendo o principal criadouro de *Ae. aegypti*. Reservatórios permanentes para o consumo humano propiciam excelentes condições para a criação do vetor, contribuindo assim para a manutenção de populações desse mosquito, mesmo em períodos não favoráveis, como nos meses de baixas precipitações (FORATTINI; BRITO, 2003; PIOVEZAN et al., 2012). Além disso, o *Ae.*

albopictus tem sido cada vez mais encontrado em regiões intra e peridomiciliares de cidades brasileiras de médio e grande porte (MARTINS et al., 2010; CARVALHO et al., 2014).

Em muitas regiões do mundo, mosquitos do gênero *Aedes* apresentam um forte padrão sazonal associado com temperatura e precipitação. A ocorrência de chuvas fortes e contínuas, intercaladas com períodos curtos sem pluviosidade, está associada com a eclosão dos ovos em massa e um aumento no número de mosquitos (NDIAYE et al., 2006; ESTALLO et al., 2015).

Durante o período avaliado, verificou-se que os maiores índices de coleta de espécimes de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram encontrados nos meses de dezembro e janeiro, e em alguns anos, em fevereiro, março e abril. Esses resultados corroboram com os de Souza et al. (2010) que também notaram alta incidência do *Ae. aegypti*, nos meses de dezembro e janeiro, no Estado de Goiás. Em São Paulo, o estudo de Serpa et al. (2006) enfatizou o mês de abril como o de maior pico no encontro de imaturos das duas espécies de mosquito.

No presente estudo, houve correlação positiva entre quantidade de fêmeas coletadas de *Ae. aegypti* e as variáveis temperaturas máxima e mínima, e correlação negativa entre a densidade de mosquitos desta espécie e a umidade relativa do ar (Tabela 6). As correlações positivas evidenciam que à medida que ocorreu uma elevação dessas temperaturas, houve um acréscimo na quantidade de espécimes coletados, bem como uma correlação negativa denotou uma diminuição na quantidade de espécimes coletados com o aumento da umidade relativa do ar. Em relação às fêmeas de *Ae. albopictus*, observou-se semelhantes correlações entre o número de espécimes e os fatores climáticos analisados. A correlação foi positiva entre quantidade de fêmeas capturadas e temperaturas máxima e mínima, não havendo correlação entre espécimes e pluviosidade e ou umidade relativa do ar (Tabela 9). Esse resultado indicou que o aumento das temperaturas favoreceu um acréscimo na quantidade de exemplares de *Ae. albopictus* capturados, semelhante ao observado em *Ae. aegypti*, para as referidas variáveis.

Na pesquisa realizada por Glasser e Gomes (2002) para identificar a influência de fatores climáticos e a distribuição das populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no Estado de São Paulo, observou-se a influência da temperatura nos padrões de expansão geográfica somente para o *Ae. aegypti*. Além disso, alguns autores apontam que as condições climáticas, caracterizadas pelas precipitações atmosféricas e temperaturas elevadas, em geral mostram relação positiva com a transmissão de dengue (FORATTINI, 2002; CHRETIEN et al., 2015).

No estudo realizado em Belo Horizonte, o terceiro período de coleta (outubro de 2012 a maio de 2013) foi o de maior número de espécimes de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

coletados. Esse período, também foi o de maior registro de casos de dengue entre os anos de estudo e apresentou picos de chuva em novembro e janeiro, além de temperaturas que variaram de 14,8°C a 33,4°C (INMET, 2012b, 2013). Carrington et al. (2013) testaram o efeito das flutuações de temperatura na competência vetorial em *Ae. aegypti* infectados com o DENV-1. Esses autores verificaram que o grupo de mosquitos submetidos a oscilações de temperatura entre 30°C (durante o dia) a 20°C (durante a noite), apresentou um aumento na proporção da infecção disseminada (presença de vírus ou antígenos virais em qualquer parte do corpo) em 60%, aos 21 e 28 dias pós-exposição em comparação com o grupo de mosquitos que permaneceram apenas a 20°C constantemente. Isso evidenciou que o aumento da temperatura favoreceu o aumento na taxa de infecção disseminada ao sorotipo do vírus.

Em Belo Horizonte, o primeiro período (dezembro de 2010 a maio de 2011) correspondeu ao de menor número de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas. Nesse período a temperatura variou entre 15°C e 31,4°C (INMET, 2010, 2011). Para o *Ae. albopictus* o segundo período (outubro de 2011 a maio de 2012) que apresentou variação de temperaturas entre 15,4°C e 31,7°C (INMET, 2011, 2012b), foi o de menor captura da espécie. A temperatura é um dos principais fatores ecológicos associados com o desenvolvimento e hábitos de alimentação do *Ae. aegypti* (FOCKS et al., 1993; FOCKS, 2003). Vários autores têm estudado o efeito da variável no desenvolvimento desse vetor (CALADO; SILVA, 2002). Beserra et al. (2006) estudaram o ciclo de vida do *Ae. aegypti* em quatro diferentes temperaturas e descreveram que aquelas entre 21°C e 29°C foram as mais favoráveis para o seu desenvolvimento. Farnesi et al. (2009) observaram que uma baixa temperatura (16°C) ou uma muito alta (36°C) podem atuar como fatores limitantes em relação ao desenvolvimento e crescimento da população.

Em estudo feito em laboratório, acerca do efeito da temperatura sobre a população de *Ae. aegypti*, Yang et al. (2009) concluíram que o intervalo de 15°C a 30°C é o mais adequado para a sobrevivência de mosquitos adultos enquanto que o intervalo entre 15°C e 35°C foi considerado uma variação ótima para as fases aquáticas. Lopes et al. (2014) verificaram na cidade de São Vicente, Estado de São Paulo, o tempo de desenvolvimento do *Ae. aegypti* pela comparação de curvas de sobrevivência do vetor criado individualmente e coletivamente. As observações foram feitas dentro e fora do ambiente laboratorial no inverno e na primavera (a temperatura mínima da água atingiu 20°C no inverno e 26°C na primavera). Esses autores constataram que as larvas posicionadas dentro do laboratório apresentaram menor tempo mediano de desenvolvimento no experimento individual e coletivo (nove e dez dias, respectivamente) (LOPES et al., 2014).

A temperatura, a umidade relativa do ar e a precipitação foram importantes fatores que influenciam a variação sazonal do *Ae. aegypti* em São Luís, Estado do Maranhão. Os resultados de Bezerra et al. (2013) mostraram uma tendência para o desenvolvimento de mosquitos durante os períodos de redução de temperatura (22,30°C) e aumento da umidade relativa do ar (87,43°C), assim como da precipitação (537,6 mm³).

Apesar do índice pluviométrico não ter apresentado uma correlação significativa com o número de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados semanalmente, observou-se nesta pesquisa, para as duas espécies, um aumento considerável na densidade de mosquitos capturados após os picos de chuvas, registrados principalmente nos meses de dezembro e janeiro, nos quatro períodos de coleta (Gráficos 3, 4, 5, 6, 17, 18, 19 e 20). Em relação ao *Ae. albopictus*, o segundo período (outubro de 2011 a maio de 2012) apresentou um padrão diferenciado (Gráfico 18). Nesse período, o volume de chuvas registrados de novembro a janeiro foi elevado, sugerindo que as chuvas contínuas e de grande porte, podem interferir no desenvolvimento da espécie. Uma possível explicação é o aumento exagerado do nível de água nos criadouros do mosquito, em sua maioria naturais, comportamento típico do *Ae. albopictus*, de modo que a água ali presente transborde constantemente, e as formas imaturas escapem do recipiente, e não completem o seu desenvolvimento.

É conhecida a existência de relação entre chuvas e reprodução de mosquitos *Aedes* (GOMES et al., 2003). Chiaravalloti-Neto (1997) observou em município situado à oeste do Estado de São Paulo que o período de chuvas, de novembro a abril, foi considerado importante para a reprodução de *Ae. albopictus*. O *Ae. aegypti* se torna mais abundante durante a estação chuvosa provavelmente devido à presença de recipientes com água acumulada da chuva, em imóveis habitados e ou terrenos abandonados. Pinheiro e Tadei (2002) ao pesquisarem formas imaturas do *Ae. aegypti*, em Manaus, Estado do Amazonas, verificaram no período chuvoso, pneus, frascos, garrafas, recipientes de armazenamento de água (tanques, caixas d' água, baldes, entre outros), peças e materiais de construção, como os criadouros mais produtivos do vetor. O estudo de Glasser et al. (2011) no litoral do Estado de São Paulo, revelou que as áreas coletivas de prédios e os imóveis não residenciais de grande porte apresentaram as maiores taxas de positividade para *Ae. aegypti* enquanto os apartamentos, tiveram as menores, no período chuvoso.

As chuvas e a temperatura mínima foram preditores significativos na atividade de oviposição semanal do *Ae. aegypti* observada no estudo de Ibarra et al. (2013) em duas localidades urbanas do Equador. Esses autores verificaram a presença de um alto percentual de pupas (65%), em relação às formas imaturas pesquisadas, em contêineres abandonados e

de uso doméstico durante a estação chuvosa. Esses fatores também tiveram associação com densidades populacionais de *Ae. aegypti* em períodos que variaram de setembro a maio e janeiro a maio na pesquisa de Duncombe et al. (2013), na Austrália. Outros autores descrevem que a dinâmica de oviposição do *Ae. aegypti* está associada positivamente com a precipitação (PONTES et al., 2000; HAYDEN et al., 2010; IBARRA et al., 2014; FONSECA et al., 2015).

No estudo de Belo Horizonte, observou-se uma correlação positiva entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas semanalmente nos quatro períodos de estudo (Gráfico 29). A correlação testada para as mesmas variáveis por DS, também revelou associações significativas em Pampulha, Norte e Leste (Gráficos 30, 31 e 32). Esses resultados apontam para o aumento no encontro de espécimes de ambas as espécies no campo, apesar da predominância de *Ae. aegypti* nos locais de coleta.

Vários autores têm estudado a competição entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em relação aos seus locais de encontro (PASSOS et al., 2003; SERPA; KAKITANI; VOLTOLINI, 2008). O *Ae. aegypti* desenvolveu um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, com hábito predominantemente urbano (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A adaptação aos criadouros artificiais foi um grande passo em direção à sinantropia, e na atualidade esse mosquito depende dos recipientes manufaturados pelo homem (NATAL, 2002). Já o *Ae. albopictus*, tem potencial para se dispersar em diversos habitats, tanto na zona rural como na urbana e sua presença nessas áreas evidencia a dispersão do ambiente silvestre para o urbano (ALBUQUERQUE et al.; 2000; MILLER; LOAIZA, 2015). As duas espécies podem coexistir na mesma região e utilizar criadouros de características semelhantes. Colonizam rapidamente locais onde as condições são favoráveis para sua proliferação e, embora as fêmeas não percorram grandes distâncias, sua dispersão é rápida dependendo da disponibilidade de sítios para oviposição (FORATTINI, 2002; FANTINATTI, 2007). Serpa et al. (2013) encontraram no município de São Sebastião, Estado de São Paulo, em armadilhas de oviposição instaladas no campo, percentuais de 89,5% e 10,5% para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente.

Nos três DS visitados durante todo o período de estudo, Pampulha, Norte e Leste foram capturadas 4.066 (38,13%), 4.287 (40,22%) e 2.309 (21,65%) fêmeas de *Ae. aegypti* e 234 (45,80%), 99 (19,37%) e 178 (34,83%) fêmeas de *Ae. albopictus*, respectivamente. Para o *Ae. aegypti*, os DS Pampulha e Norte tiveram maiores medianas de mosquitos do que o DS Leste em todo o estudo (Gráfico 2B). Em relação ao *Ae. albopictus*, os DS Pampulha e Leste tiveram maiores medianas de mosquitos do que o DS Norte (Gráfico 16B).

Esses resultados do encontro de mosquitos *Ae. aegypti* em diferentes DS e períodos, mostram que o número de mosquitos coletados no DS Pampulha manteve-se elevado em todo o estudo. No entanto, nos DS Norte e Leste, observou-se uma diferenciação quanto às espécies pesquisadas, já que o DS Norte apresentou maior quantidade de *Ae. aegypti* quando comparado com o DS Leste, e este por sua vez, obteve maior encontro de mosquitos *Ae. albopictus* do que o DS Norte. Apesar de não ter sido objetivo do presente estudo, observou-se nos três DS a existência de recipientes que poderiam ser criadouros para o *Ae. aegypti*, a exemplo de pratos usados como base em vasos de plantas, garrafas, latas e mesmo piscinas em desuso com água acumulada de chuvas. A existência desses recipientes pode sugerir a realização de estudos mais detalhados sobre a dinâmica de oviposição do vetor em Belo Horizonte.

No que diz respeito ao *Ae. albopictus*, observou-se que o terceiro (outubro de 2012 a maio de 2013) e quarto (outubro de 2013 a maio de 2014) períodos de coleta, apresentaram quantidades superiores de mosquitos capturados que o primeiro (dezembro de 2010 a maio de 2011) e segundo (outubro de 2011 a maio de 2012) períodos (Gráfico 15A). Esse resultado mostra um aumento considerável nas capturas desta espécie em Belo Horizonte, o que pode estar relacionado a uma mudança de comportamento do *Ae. albopictus*, que parece mais adaptado ao meio urbano. Ressalta-se que os três DS apresentam regiões com considerável área vegetal. A Pampulha apresenta uma das maiores áreas verdes da capital, o correspondente a 300.000 m², onde se encontra o Parque Ecológico Promotor Francisco Lins do Rego. Por sua vez, o DS Norte possui a maior área verde de Belo Horizonte, com 87 áreas, destinadas a parques e áreas de conservação permanente. Leste tem como principais áreas verdes a mata do Museu de História Natural da UFMG e parte dos parques da Baleia, Marcus Pereira de Melo e do Centenário, que abrigam diversas espécies da fauna e da flora brasileira (PBH, 2015a). O maior encontro do *Ae. albopictus* neste estudo, ocorreu em armadilhas instaladas próximos dessas áreas, nos quatro períodos de coleta (dados não descritos nesta tese).

No entanto, no decorrer do trabalho de campo, armadilhas que anteriormente não capturavam *Ae. albopictus*, passaram a ter registros do mosquito, em especial no terceiro (outubro de 2012 a maio de 2013) e quarto (outubro de 2013 a maio de 2014) períodos. Em relação a esse achado, Forattini (2002) considera que o *Ae. albopictus* merece vigilância, tendo em vista que esse mosquito pode se tornar uma ponte entre os ciclos silvestre e urbano da dengue e da febre amarela, além de outros arbovírus no Brasil, considerando-se sua facilidade de frequentar igualmente os ambientes silvestres, rurais, suburbanos e urbanos.

De acordo com o MS (2014c), a atualização do Levantamento Rápido do Índice de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA) realizado em dezembro de 2014, revelou que 125 municípios brasileiros se encontravam em situação de risco para a ocorrência de epidemias de dengue devido aos achados de imaturos do vetor: 552 estavam em situação de alerta e 847 cidades apresentaram índice satisfatório. O município de Belo Horizonte apresentou médio risco, com LIRAA de 1,2% em março de 2014; os DS Pampulha, Norte e Leste tiveram os percentuais de 1,3%, 1,0% e 1,8%, respectivamente para o levantamento. Já em outubro de 2015 os índices do LIRAA para os respectivos DS foram: 0,8% para Pampulha, 0,3% para Norte e 0,7% para Leste. O município de Belo Horizonte teve percentual geral de 0,6% (PBH, 2015b).

Estudos de Pessanha et al. (2012) apontam para a necessidade de uma vigilância contínua dos vetores da dengue em Belo Horizonte, com a utilização de ovitrampas e vistoria nos focos de larvas, de modo que um maior número de áreas com potencial de transmissão para a dengue, possam ser identificados. Adicionalmente, Freitas, Rodrigues e Almeida (2011) destacam a necessidade da implementação da coleta seletiva de lixo, com expansão a todas as regiões da capital mineira, e da discussão do armazenamento, muitas vezes inadequado, de embalagens descartáveis usadas como fonte geradora ou de complementação de renda pela população de menor nível socioeconômico. A coleta seletiva no município abrangia, em 2008, apenas 28 dos 489 bairros, recolhendo 7% do lixo potencialmente reciclável. Dados mais recentes, no entanto, mostram que o serviço de coleta domiciliar porta a porta abrange 93% da extensão das vias formalmente urbanizadas e 72% da extensão das vias das vilas, favelas e conjuntos habitacionais, contemplando 95% da população de Belo Horizonte. A área dos três DS em estudo é abrangida por esse serviço (PBH, 2015c).

Outro dado relevante diz respeito à situação do *Ae. albopictus* no país. Em 2014, esta espécie foi detectada em 59% dos 5.565 municípios brasileiros pesquisados, o equivalente a um aumento de 51,6% no número de municípios infestados em relação a 2011. O estudo mostra ainda a ocorrência de *Ae. albopictus* em 23 das 27 unidades federativas do Brasil, com distribuição geográfica mais ampla nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, onde 1.489 (89,3%), 748 (63%) e 245 (52,6%) municípios foram infestados, respectivamente. Os percentuais de municípios infestados foram muito menores nas regiões Norte (139 municípios, 31%) e Nordeste (63, 37%), o que evidencia o avançado processo de urbanização desse mosquito (CARVALHO et al., 2014).

Distintamente, já é bem conhecida a tendência natural do *Ae. aegypti* para se dispersar amplamente através de uma variedade de habitats, o que é provavelmente facilitada

pela sua capacidade para depositar seus ovos em uma ampla diversidade de recipientes. Vezzani e Schweigmann (2002) apontaram os recipientes plásticos como os de maior encontro de larvas de *Ae. aegypti* em cemitérios de Buenos Aires, Argentina. Em Vitória, Estado do Espírito Santo, Varejão et al. (2005) identificaram as bromélias como potenciais criadouros para a espécie. Os depósitos de armazenamento de água (barril e tanque) foram incriminados como os mais produtivos criadouros para o vetor da dengue, pelo encontro frequente de imaturos nesses recipientes, em Cabo Verde (DUARTE et al., 2013) e também nos vários estudos desenvolvidos no Brasil. Em Caxias, Estado do Maranhão, os recipientes de armazenamento, como tanques, baldes, e outros para estocagem de água, também foram os que mais apresentaram larvas de *Ae. aegypti* na pesquisa de Soares-da-Silva et al. (2012). Os recipientes de estocagem de água são usados pela população, em vários estados brasileiros, devido a interrupções no fornecimento de água encanada.

Devido a um período longo de estiagem que abrangeu todo o Sudeste do Brasil em 2014 e primeiros meses de 2015, a respeito do abastecimento de água no Estado de Minas Gerais, alguns municípios mineiros tiveram problemas no fornecimento de água, a exemplo de Divinópolis, Santa Luzia e algumas regiões de Belo Horizonte (COPASA, 2015). Essa interrupção emergencial e frequente no fornecimento de água, mobiliza a população afetada a armazenar água para consumo doméstico, e por sua vez, a forma descuidada em manter os recipientes de armazenamento, na maioria das vezes destampados, pode facilitar a oferta de locais para a proliferação do *Ae. aegypti* e do *Ae. albopictus*, como ocorre em alguns Estados da região Nordeste do país (MARTINS et al., 2010; SOARES-DA-SILVA et al., 2012).

Outro ponto a ser destacado e apontado anteriormente por Forattini (2002), diz respeito a estimar a presença do *Ae. albopictus* em criadouros previamente ocupados somente pelo *Ae. aegypti*. Martins et al. (2010) verificaram em Fortaleza, Estado do Ceará, que em diversos criadouros a ausência de uma das espécies favorecia sua infestação por outra. Esses autores demonstraram que criadouros não infestados por *Ae. albopictus* tinham uma prevalência de infestação de 2,05 vezes maior pelo *Ae. aegypti*.

No presente estudo, houve o encontro de ambas as espécies nos três DS pesquisados. Em algumas armadilhas instaladas no campo, houve maior encontro de *Ae. aegypti*, naquelas situadas em bairros na região central dos DS, e maiores achados de *Ae. albopictus* em armadilhas instaladas em bairros mais arborizadas e periféricos. Em pelo menos 20% das armadilhas era frequente a captura de ambas as espécies (dados não descritos nesta tese).

Em decorrência da grande diversidade que o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* podem apresentar para locais de oviposição, em residências e em outros imóveis (creches, postos de

saúde, escolas), a exemplo dos locais de instalação de armadilhas no presente estudo, faz-se necessária à adoção de estratégias de monitoramento contínuo. Dessa forma, em especial nos três DS estudados, poder-se-ia estabelecer que locais são considerados mais produtivos para o *Ae. aegypti* e para o *Ae. albopictus* rotineiramente, somando-se esses resultados aos obtidos pelos serviços de controle já adotados. Além disso, para se conhecer a situação epidemiológica de infestação desses mosquitos, outra medida sugerida é a busca e descrição detalhada dos recipientes conhecidos e considerados potenciais criadouros.

5.2 Amostras positivas para o Dengue vírus por períodos e semanas

O ciclo de transmissão da dengue inclui o homem doente, qualquer dos quatro sorotipos do vírus da dengue, o mosquito vetor do gênero *Aedes* e o homem suscetível. A transmissão da doença ao homem suscetível se dá pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados pelo DENV. As principais espécies envolvidas são o *Ae. aegypti*, o *Ae. albopictus* e as espécies do complexo *Aedes scutellaris*. O período de incubação da dengue no homem (período de incubação intrínseco) é de sete a 10 dias (SALAZAR et al., 2007). O período de viremia no hospedeiro humano, quando o repasto sanguíneo torna o mosquito infectado, inicia-se um dia antes do aparecimento da febre e permanece até o sexto dia da enfermidade. O período de incubação no mosquito (período de incubação extrínseco) é de oito a 14 dias, momento a partir do qual ele se torna infectante, assim permanecendo pelo resto da vida (RICO-HESSE, 1990; PONTES; RUFFINO-NETO, 1994).

A circulação e a perpetuação do DENV na natureza, na estrutura epidemiológica atual, se deve ao hospedeiro humano infectado, e ao vetor da enfermidade, os mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente nos grandes centros urbanos onde a doença se mantém sob forma endemo-epidêmica. Mendonça et al. (2009) apontam diversos fatores para a recorrente formação de epidemias de dengue nos países tropicais e subtropicais. Dentre esses fatores, destacam-se a proliferação do mosquito *Ae. aegypti*, o rápido crescimento demográfico associado à intensa e desordenada urbanização, a inadequada infra-estrutura urbana, o aumento da produção de resíduos não-orgânicos, os modos de vida na cidade, a debilidade dos serviços e campanhas de saúde pública, bem como o despreparo dos agentes de saúde e da população para o controle da doença. Por outro lado, o vetor desenvolve resistências a inseticidas cada vez mais evidentes às diversas formas de seu controle (MENDONÇA et al., 2009).

É possível que a transmissão vertical transovariana represente outra forma de manutenção do vírus da dengue em algumas situações muito específicas em zonas rurais,

florestas e/ou cidades, nos períodos inter-epidêmicos ou de ausência de chuvas. A transmissão transovariana do vírus da dengue ocorre com probabilidades variadas dependendo da cepa do vírus, método de infecção e espécie do mosquito (FOUQUE et al., 2004; LEE; ROHANI, 2005). Além disso, o vírus que infecta machos pode ser repassado a fêmeas através do mecanismo de transmissão venérea durante o acasalamento, e por sua vez, as fêmeas infectadas podem propagar verticalmente o vírus para sua prole (ROSEN, 1987; TU et al., 1998).

No entanto, para que a doença seja disseminada, isto é, ocorram epidemias, deve-se considerar a competência vetorial dos mosquitos, que é definida como a capacidade intrínseca de um artrópode a tornar-se infectado e posteriormente transmitir um agente patogênico, a exemplo do DENV (KRAMER; EBEL, 2003). Os estudos sobre competência vetorial relacionados à cinética da replicação e tropismo do DENV nas populações do gênero *Aedes* são importantes, pois podem contribuir para uma melhor compreensão do potencial de transmissão e da interação vírus-vetor, fatores que condicionam a epidemiologia da dengue em uma determinada localidade (GONÇALVES, 2010; GUEDES, 2012; MOURA et al., 2015).

No presente estudo, a positividade de pools de mosquitos *Ae. aegypti* revelou um padrão semelhante ao longo dos quatro anos de estudo. Verificou-se que os primeiros pools positivos foram identificados em dezembro (Gráficos 7 e 10), e logo em seguida, observou-se uma diminuição no encontro de amostras positivas para o DENV. Um aumento dos pools positivos ocorreu novamente em meados de fevereiro e abril. Vale ressaltar que o terceiro período mostrou um padrão diferente, tendo em vista os achados de fêmeas de *Ae. aegypti* positivas em praticamente todas as semanas de capturas, provavelmente devido à ocorrência de uma grande epidemia causada pelos DENV-1 e DENV-4 (Gráfico 9). Porém, vale ressaltar que o monitoramento semanal das regiões apontou a presença do vírus em todos os anos de coleta para ambas as espécies em todos os DS.

Para o *Ae. aegypti*, por exemplo, Pampulha, Norte e Leste obtiveram, 36,73%, 39,08% e 24,19% de pools positivos da espécie, considerando os quatro períodos de estudo. Ao longo dos anos, o DS Pampulha obteve a maioria dos percentuais de positividade das amostras, considerando-se cada período separadamente. Somente no terceiro período, o DS Norte apresentou maior percentual de fêmeas infectadas (Tabela 7). Durante a pesquisa em Belo Horizonte observou-se que os DS Norte e Leste tiveram os maiores registros de casos de dengue com 21.918 e 14.660, respectivamente. Nos quatro anos de estudo, Pampulha obteve 12.284 notificações da doença (PBH, 2010, 2011, 2012a, 2013, 2014). Isso pode sugerir que

nem sempre a região que apresenta maior número de mosquitos positivos é também aquela que apresenta uma população de competência vetorial considerada alta, isto é, capaz de transmitir o vírus a seres humanos causando um maior impacto na ocorrência de epidemias. Gonçalves (2010), verificou em estudo sobre a competência vetorial das populações de *Ae. aegypti* dos nove DS de Belo Horizonte, que os mosquitos do DS Norte foram mais competentes ao DENV-2, dos quais 70% das fêmeas analisadas por RT-PCR apresentaram o vírus nas glândulas salivares, após 14 dias de infecção artificial em laboratório.

No que diz respeito ao *Ae. albopictus* houve o encontro de 41,79%, 30,37% e 27,84% de fêmeas positivas para o DENV, nos DS Pampulha, Norte e Leste, respectivamente. Para essa espécie as porcentagens de fêmeas positivas considerando cada período separadamente foram maiores do que a quantidade de pools positivos de *Ae. aegypti* (Tabela 10). Guedes (2012) ao estudar a competência vetorial de populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* do Estado de Pernambuco, verificou que ambas as espécies foram competentes para transmitir sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue, em laboratório.

Ainda em relação ao *Ae. albopictus*, a presença de fêmeas positivas para o DENV, por algumas vezes coincidia com os registros de *Ae. aegypti*. No entanto, diferente do que aconteceu ao *Ae. aegypti*, foi o segundo período o de maior ocorrência de amostras positivas para o *Ae. albopictus* (Gráfico 22). Em quase todas as amostras capturadas e analisadas, verificou-se a presença do DENV, o que tornou esse período com um padrão bastante diferenciado. Observou-se na realização da RT-PCR em Tempo Real que apesar do encontro considerável de fêmeas de *Ae. albopictus* infectadas pelo DENV nesse período, a quantidade de cDNA de vírus das amostras positivas foi bastante reduzida (variando de uma ao valor máximo de 60 cópias). Essa quantidade de cDNA de vírus foi relativamente maior em *Ae. aegypti* (variando de uma ao valor máximo de 300.00 cópias) (dados não descritos na tese). Com base nesses resultados, não se pode afirmar que o *Ae. albopictus* esteja transmitindo o DENV em Belo Horizonte, no entanto este mosquito parece albergar o patógeno, principalmente em períodos do não encontro de fêmeas infectadas de *Ae. aegypti*.

Verificou-se neste estudo que o aumento na positividade das amostras tem sido registrado em épocas diferentes para cada uma das espécies. O encontro de fêmeas de *Ae. aegypti* positivas para o DENV foi mais frequente no terceiro período quando houve epidemia, e se registrava mais de 5.000 casos da doença em seres humanos, em algumas semanas (Gráfico 13). Contudo, as fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o vírus foram capturadas em sua maioria no segundo período (Gráfico 22), quando eram registrados cerca de 50 casos da doença por semana nos três DS. Sanchez-Rodríguez et al. (2014) apontam o

Ae. albopictus como um mosquito responsável por manter a circulação de DENV em períodos inter-epidêmicos em Monterrey, México.

Para se verificar o papel de vetor do *Ae. albopictus* de campo, sugere-se a realização de estudos que investiguem a competência vetorial desta espécie, pela presença do vírus em diferentes regiões do organismo do inseto, como nas glândulas salivares. As diferenças na capacidade das populações de vetores para adquirir infecção pelo DENV podem ajudar a explicar alguns aspectos intrigantes da epidemiologia da dengue (PONGSIRI et al., 2014). No estudo de Belo Horizonte, apesar do encontro frequente de *Ae. albopictus* positivos para o DENV no segundo período de coleta (Gráfico 26), não se notou uma elevada ocorrência de casos de dengue nos três DS. Isso pode sugerir que o mosquito esteja apenas mantendo a circulação do vírus no ambiente. Em contraste, no terceiro período (Gráfico 27) quando houve epidemia, também se notou o aumento no encontro de pools de *Ae. aegypti* positivos para o DENV (Gráfico 13), confirmando a alta competência desta espécie na manutenção e transmissão do vírus naqueles anos de estudo.

Foram analisados para a presença de DENV, 6.056 pools de fêmeas de *Ae. aegypti* (Gráficos 7, 8, 9 e 10) e 511 fêmeas (individualmente) de *Ae. albopictus* (Gráficos 21, 22, 23 e 24), nos quatro períodos. A positividade das amostras (taxa de infecção) teve índices diferenciados para as duas espécies em cada período. Aos pools de *Ae. aegypti* corresponderam aos percentuais de positividade de 5,53% (primeiro período), 6,12% (segundo), 9,02% (terceiro) e 2,13% (quarto). Para o *Ae. albopictus* as porcentagens de positividade foram maiores: 22,22% (primeiro período), 84,0% (segundo), 5,52% (terceiro) e 3,31% (quarto). Semelhantes às taxas encontradas no estudo realizado em Belo Horizonte, Angel e Joshi (2009) encontraram positividade de 15,6% para o DENV nos 498 adultos de *Ae. aegypti* que analisaram na Índia, ao realizarem Immunofluorescence Antibody Assay (IFA). Esses autores verificaram ainda os sorotipos do DENV, identificando positividade para os quatro, nas amostras de campo.

Costa et al. (2009) tiveram resultados semelhantes aos deste trabalho, quando dos 138 pools de mosquitos *Ae. aegypti* coletados em Manaus, Estado do Amazonas, detectaram o DENV em 111, o equivalente a 80,43% de positividade das amostras, utilizando isolamento viral e RT-PCR. Martins et al. (2012) também encontraram altas taxas de positividade em mosquitos do campo, ao coletarem em Fortaleza, Estado do Ceará, entre os anos de 2007 e 2009. Esses autores coletaram 3.417 adultos de *Ae. aegypti* e 336 *Ae. albopictus* e analisaram a presença de DENV nas amostras (em pools) por RT-PCR e IFA. A positividade foi

encontrada em 70% e 97,1% dos pools analisados de *Ae. aegypti* (infecção por DENV-2) e *Ae. albopictus* (infecção por DENV-3), respectivamente.

Pessanha et al. (2011) coletaram ovos de ambas as espécies em diferentes DS de Belo Horizonte (Centro-Sul, Leste e Venda Nova), Estado de Minas Gerais, e após a eclosão, verificaram que das amostras de larvas de *Ae. aegypti*, 163 (37,4%) de 435 analisadas foram positivas, incluindo 32 (10,9%) de 293 amostras individuais que foram concomitantemente positivas para dois sorotipos, pela RT-PCR. Em relação aos *Ae. albopictus* esses autores encontraram 5 (50,0%) larvas positivas das 10 analisadas, na capital mineira. Também na cidade de Belo Horizonte, Vilela et al. (2010) testaram adultos e larvas de *Ae. aegypti* para a presença de DENV, por RT-PCR, entre os anos de 2005 e 2006. Esses autores encontraram as seguintes taxas de infecção: 10,0% para machos adultos de 100 analisados, 21,9% para fêmeas adultas de 137 analisadas e 0,18% de 5.573 larvas da espécie, coletadas em campo.

Em outros países, as taxas de infecção de DENV em mosquitos de campo, também mostram variações. Bara et al. (2013) encontraram larvas de *Ae. albopictus* infectadas com três sorotipos do patógeno na cidade de Louisville, nos EUA, totalizando 33,0% de positividade nas amostras testadas por RT-PCR. Em Monterrey, México, Sanchez-Rodríguez et al. (2014) também encontraram um grupo positivo de 30 pools de adultos de *Ae. albopictus* provenientes de ovitrampas, cujos ovos coletados foram colocados para eclosão. Ao estudarem a infecção natural de mosquitos do gênero *Aedes* utilizaram a RT-PCR. Esses autores não encontraram adultos de *Ae. aegypti* positivos para o vírus, durante o ano de 2010, em que realizaram a análise.

Em contraste, Chen et al. (2010), coletaram mosquitos de ambas as espécies em Taiwan, entre os anos de 2004 e 2007. Esses autores encontraram positividade de 0,2% em 7.628 pools de *Ae. aegypti* nos meses de julho a dezembro, e nenhum *Ae. albopictus* infectado. O número de mosquitos por pool nesse trabalho variou de um a 50, e para analisar a presença de DENV nos espécimes foram utilizados ensaios de RT-qPCR. Kow et al. (2001), em Cingapura, também encontraram baixos percentuais de positividade para o *Ae. aegypti* e para o *Ae. albopictus* no campo, o correspondente a 1,33% e 2,15% respectivamente, entre os anos de 1997 e 1998, ao realizarem ensaios de RT-PCR. Resultado este semelhante ao de Paingankar et al. (2014) cujos achados de amostras positivas para o vírus em mosquitos adultos corresponderam a 2,33% dos 556 pools analisados, sendo estes formados por um a 10 mosquitos. Esses autores utilizaram para as análises moleculares IFA, RT-PCR e sequenciamento.

Compreender o processo de transmissão de uma doença transmitida por vetores como a dengue, no entanto, não deve ser baseado somente na pesquisa da taxa de infecção de mosquitos de campo, ou mesmo na interação entre o vetor, o hospedeiro vertebrado e o patógeno. Existem outros componentes, além dessa interação, que podem afetar a transmissão das doenças transmitidas por vetores, a exemplo da dengue. Considerando os fatores relacionados ao vetor, parâmetros como abundância, taxa de sobrevivência, grau de domiciliação e comportamento alimentar, determinantes da frequência do contato do vetor com o hospedeiro, são importantes para a avaliação do risco de transmissão da doença, e do risco da ocorrência de epidemias.

5.3 Amostras positivas para o Dengue virus em culicídeos e ocorrência de casos de dengue nos Distritos Sanitários

O cenário da dengue nos quatro anos de estudo em Belo Horizonte, foi marcado por períodos de baixa e alta endemicidade, e com uma epidemia no terceiro período. Os registros da SMS revelaram a ocorrência de 2.022 (primeiro período), 1.936 (segundo período), 42.135 (terceiro período) e 2.769 (quarto período) casos da doença somente nos DS Pampulha, Norte e Leste. Em todos os períodos de coleta, houve o encontro de espécimes de *Ae. aegypti* (Gráficos 11, 12, 13 e 14) e *Ae. albopictus* (Gráficos 25, 26, 27 e 28) positivos para o DENV.

Notou-se que as primeiras coletas de *Ae. aegypti* positivos ocorriam no mês de dezembro (Gráficos 11 e 14), com exceção do terceiro período (Gráfico 13), quando foi confirmada a presença de DENV nas amostras de campo, em praticamente todas as semanas de coleta. Para o *Ae. albopictus* a positividade para o vírus foi mais frequente entre os meses de janeiro a abril (Gráficos 25, 26, 27 e 28), observando-se uma redução no encontro de exemplares positivos no terceiro e quarto períodos. O primeiro, o segundo e o quarto períodos de estudo, mostraram uma distribuição de casos de dengue semelhante, com o registro de menos de 200 casos por semana. No entanto, o terceiro período, caracterizado por uma epidemia provocada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4, apresentou registros semanais de mais de 5.000 casos (PBH, 2013). Segundo dados da SMS (PBH, 2013) foram confirmados nos nove DS de Belo Horizonte, 95.863 casos em 2013: 95.837 de dengue, 11 de dengue com sinais de alarme e 15 casos de dengue com complicações. O DS Norte registrou o maior número de casos confirmados (19.124; 20% de todos os confirmados). Oito pessoas morreram em decorrência da doença na cidade.

Pessanha et al. (2011) ao realizarem estudo sobre a epidemiologia da dengue entre os anos de 1996 e 2011, em Belo Horizonte, destacaram a circulação dos diferentes sorotipos da

doença como responsáveis por epidemias em anos diferentes. A primeira epidemia, em 1996, foi ocasionada pelo DENV-1. No final de 1997, além do registro de DENV-1, houve a circulação de DENV-2. Em 2003, por sua vez, a circulação do DENV-3 foi registrada pela primeira vez na cidade.

No presente estudo foi possível verificar o encontro de espécimes do gênero *Aedes* infectados em período anterior e ou concomitante à epidemia de dengue, evidenciando a circulação de DENV, mesmo quando a doença encontrava-se com baixa incidência. Bezerra et al. (2013) investigaram a presença de DENV em fêmeas e machos de *Ae. aegypti* na cidade de São Luís, Estado do Maranhão. No entanto, esses autores não encontraram amostras de campo positivas para o vírus nos anos de 2008 e 2009, e destacaram que esse resultado negativo pode ter influência da baixa ocorrência de casos de dengue no município naqueles anos. Além disso, esses autores usaram RT-PCR para a pesquisa do vírus e não RT-PCR em Tempo Real como em Belo Horizonte, sendo esta última técnica mais sensível para a detecção de baixas quantidades do vírus nos espécimes de campo (GURUKUMAR et al., 2009; LEPARC-GOFFART et al., 2009).

Observou-se no presente estudo que nos períodos não epidêmicos (primeiro, segundo e quarto) o número de pools positivos de *Ae. aegypti* por semana, apesar da menor frequência no encontro, apresentavam-se em maior número em uma única semana. Pode-se citar como exemplo a semana 14 que apresentou 34 pools positivos no primeiro período (Gráfico 11), 11 no segundo (Gráfico 12), 28 no quarto (Gráfico 14), e no terceiro período, quando houve epidemia de dengue, a mesma semana notificou apenas cinco pools positivos para o DENV (Gráfico 13), e por semanas seguidas houve o achado de positividade nas amostras.

A positividade para o *Ae. albopictus*, por sua vez, foi menor do que em *Ae. aegypti* no primeiro (Gráfico 21), terceiro (Gráfico 23) e quarto períodos (Gráfico 24), o que sugere que o *Ae. albopictus* esteja somente auxiliando na manutenção do vírus na natureza, mediante a sua não comprovação como vetor até o momento, em Belo Horizonte e em todo o país. Em suma, a realização de análises de mosquitos de campo pode dar respostas sobre o período de início da circulação viral e também em que períodos do ano há intensificação da presença de DENV, como verificado no trabalho de Belo Horizonte, nos quatro períodos de estudo. Isso pode permitir o combate ao vetor de forma antecipada à ocorrência de casos de dengue na população.

5.4 Considerações finais

O controle da dengue é um enorme desafio no Brasil e no mundo. É a principal doença re-emergente e mais de dois e meio bilhões de pessoas na Ásia, África e nas Américas correm, atualmente, o risco de adquiri-la. O único elo vulnerável de sua cadeia de transmissão, com os recursos científicos e tecnológicos hoje disponíveis, é o vetor. O mosquito *Ae. aegypti* apresenta uma facilidade enorme de adaptação a diversas condições do meio, a exemplo da oviposição em diferentes criadouros disponíveis, a resistência dos ovos a longos períodos de dessecação, entre outros. Essa facilidade de adaptação do vetor, muitas vezes dificulta o seu controle.

A investigação das taxas de infecção em mosquitos fornece informações sobre os sorotipos de dengue circulantes em determinadas localidades, antes que a doença seja transmitida em níveis mais elevados, possibilitando a adoção de medidas preventivas que evitem epidemias. Os mosquitos infectados podem ser detectados em um período de até seis semanas antes do início de surtos (PINHEIRO et al., 2005; SAMUEL; TYAGI, 2006; COSTA et al., 2009; CHEN et al., 2010). O monitoramento da circulação viral em vetores, com a técnica de RT-qPCR, apresentou-se como mais uma alternativa frente aos métodos usados na rotina de controle do vetor, permitindo identificar com antecedência e confiabilidade os níveis de disseminação do vírus. Essa metodologia se faz extremamente necessária na cidade de Belo Horizonte, devido à circulação dos quatro sorotipos do vírus.

No entanto, no Brasil ainda existem poucas pesquisas voltadas para a detecção de DENV em mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Atualmente, o *Ae. aegypti* é o principal vetor da dengue, e, embora o *Ae. albopictus* tenha sido incriminado por epidemias desta arbovirose em pequena escala como vetor secundário, em especial na região da Ásia, este é considerado um vetor da dengue de menor potencial quando comparado ao *Ae. aegypti*, devido a sua menor competência vetorial e reduzida aptidão para picar seres humanos (LAMBRECHTS et al., 2010). No entanto, o papel do *Ae. albopictus* como um vetor da dengue tornou-se uma grande preocupação em regiões temperadas livres de dengue, onde esse mosquito foi estabelecido na ausência de *Ae. aegypti* (DIALLO et al. 2003; LAMBRECHTS; FAILLOUX, 2012). Dada a distribuição rápida e generalizada de *Ae. albopictus*, são necessários estudos para avaliar o impacto desta espécie para a saúde pública, priorizando recursos de controle. Portanto, a melhoria dos sistemas de vigilância entomológica em processo de detecção da dengue é indispensável.

Ressalta-se que a realização de pesquisas de adultos de ambas as espécies no campo, ininterruptamente e de forma simultânea em diferentes áreas de uma localidade, pode aumentar as chances do encontro de espécimes infectados. Para isso, os órgãos de saúde pública responsáveis pela aprovação e execução dos métodos de controle, devem buscar a implementação de novas estratégias de monitoramento. Entre essas medidas, estaria a adoção de técnicas moleculares como a RT-PCR ou RT-qPCR na rotina de investigação do vírus da dengue nas amostras de campo. Certamente os resultados sobre as taxas de infecção natural poderiam ser liberados com maior rapidez, dada a sensibilidade e praticidade das técnicas.

No presente estudo se observou correlação entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e variáveis climáticas. Diante disso, sugere-se a utilização dos dados obtidos no presente estudo na construção de um modelo matemático baseado em equações diferenciais para se descrever a evolução das populações envolvidas na inter-relação entre mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e a presença de casos de dengue em seres humanos (CAVALCANTE FILHO, 2011; WYSE, 2011).

O uso de modelos matemáticos como ferramenta na predição de epidemias de dengue, poderia utilizar outras variáveis como, presença ou ausência de criadouros artificiais e naturais, para as ambas as espécies de mosquitos nos locais de coleta dos espécimes; detecção de DENV bem como de *Wolbachia* (em *Ae. albopictus*) (MOREIRA et al., 2009); circulação de diferentes sorotipos do vírus; bem como, o uso de marcadores genéticos nas populações de mosquito, em especial aqueles envolvidos na competência vetorial dos insetos, a exemplo dos genes de imunidade.

Aliado a esses conhecimentos, deve-se considerar a realização de pesquisas para fortalecer o conhecimento sobre a dinâmica da infecção e o aprimoramento das ações anti-vetoriais, estudos dos fatores de risco relacionados à ocorrência das formas graves e suas relações com a fisiopatogenia da doença. A busca pelo aprimoramento do diagnóstico da dengue, manejo e tratamento das formas severas, bem como o desenvolvimento de uma vacina também são medidas de considerável importância.

6 CONCLUSÕES

Este estudo de capturas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* durante quatro anos, possibilitou o levantamento de vários dados importantes em Belo Horizonte, uma cidade com risco constante de epidemias de dengue. Por meio desta pesquisa, demonstrou-se a possibilidade de atuar com o xenomonitoramento dos vetores, para detectar a presença de espécimes infectados, assim como sua distribuição. Pôde concluir também que:

- a) A presença de DENV foi constatada em 343 (5,66%) pools de fêmeas de *Ae. aegypti* dos 6.056 analisados;
- b) A positividade para o DENV foi verificada em 79 (15,45%) fêmeas de *Ae. albopictus* das 511 analisadas;
- c) O terceiro período de estudo apresentou a maioria dos espécimes positivos de *Ae. aegypti* para o DENV, e o segundo período, a maioria de exemplares positivos de *Ae. albopictus*, também para o vírus;
- d) O DS Norte apresentou a maioria dos pools de *Ae. aegypti* positivos para o DENV e o DS Pampulha a maioria das fêmeas de *Ae. albopictus* positivas para o vírus;
- e) Houve o encontro de exemplares de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* em todos os períodos de estudo e antes do surgimento de casos de dengue em humanos, em especial no terceiro período, caracterizado por uma epidemia da doença em Belo Horizonte;
- f) Verificou-se correlação positiva entre quantidade de fêmeas coletadas de *Ae. aegypti* e temperaturas máxima e mínima, além de correlação negativa entre umidade relativa do ar e número de fêmeas desta espécie capturadas em campo;
- g) Verificou-se correlação positiva entre quantidade de fêmeas coletadas de *Ae. albopictus* e temperaturas máxima e mínima;
- h) Foi observada uma correlação positiva entre número de fêmeas de *Ae. aegypti* e número de fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas em todo o período de estudo e nos três DS separadamente.

REFERÊNCIAS

- ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Alguns comentários sobre a vacina contra a Dengue recém-registrada na Anvisa. 2016. Disponível em <<https://www.abrasco.org.br/site/2016/01/alguns-comentarios-sobre-a-vacina-contra-a-dengue-recem-registrada-na-anvisa/>> Acesso em 10 de mai. de 2016.
- ALBUQUERQUE, C. M. R. et al. Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área da Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 34, p. 314-315, 2000.
- ANGEL, B.; JOSHI, V. Distribution of dengue virus types in *Aedes aegypti* in dengue endemic districts of Rajasthan, India. *Indian Journal of Medicine Research*, Índia, p. 665-668, 2009.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems. 2008. Disponível em <http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/ABI_StepOnePlus_qPCR_ReagentGuide.pdf> Acesso em 22 de dez. 2010.
- AYRES, M. et al. BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas versão 5.0. Belém: Ong Mamiraua, 2007. Software.
- AZIL, A. H. et al. Dengue vector surveillance programs: a review of methodological diversity in some endemic and epidemic countries. *Asia-Pacific Journal of Public Health*, Japan, v. 23, p. 827-842, 2011.
- BARA, J. J. et al. Susceptibility of Larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to DENV. *Journal of Medical Entomology*, USA, v. 50, p. 179-184, 2013.
- BESERRA, E. B. et al. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, Paraná, v. 35, p. 853-860, 2006.
- BEZERRA, J. M. T. et al. Occurrence of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in a Dengue Transmission Area at Coastal Maranhão State, Brazil. *The Open Tropical Medicine Journal*, Sharjah, v. 6, p. 1-4, 2013.
- BIOGENTS. BG-Sentinel Professional Mosquito Trap. 2008. Disponível em <<http://www.bg-sentinel.com/>> Acesso em 10 de ago. 2013.
- BONIZZONI, M. et al. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, USA, v. 29, p. 460-468, 2013.
- BORGES, S. M. A. A. Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, 2001.
- BRAGA, I. A. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 16, p. 279-293, 2007.

BRAGA, I. A. et al. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição para detecção de *Aedes aegypti*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 33, p. 347-353, 2000.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

CALADO, D. C.; SILVA, M. A. N. Avaliação da influência da temperatura sobre o desenvolvimento de *Aedes albopictus*. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 36, p. 173-179, 2002.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, United Kingdom, v. 26, p. 243-262, 1971.

CARRINGTON, L. B. et al. Fluctuations at a Low Mean Temperature Accelerate Dengue Virus Transmission by *Aedes aegypti*. PLoS Neglected Tropical Diseases, USA, v. 7, p. e2190, 2013.

CARVALHO, R. G. et al. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 109, p. 787-796, 2014.

CAVALCANTE FILHO, A. A. Dengue: Modelo Matemático para Evolução das Populações de Mosquitos e Humanos Infectados em Diferentes Estratégias de Controle. Belo Horizonte, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET/MG, 2011.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Health Map Colaboration. 2016. Disponível em: <<http://www.healthmap.org/dengue/index.php>> Acesso em 05 de abr. 2016.

CHADEE, D. D.; RITCHIE, S. A. Efficacy of sticky and standard ovitraps for *Aedes aegypti* in Trinidad, West Indies. Journal of Vector Ecology, USA, v. 35, p. 395-400, 2010.

CHEN, C. F. et al. Screening of Dengue Virus in Field-Caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by One-Step SYBR Green-Based Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay During 2004–2007 in Southern Taiwan. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, USA, v. 10, p. 1017-1025, 2010.

CHIARAVALLOTI-NETO, F. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 30, p. 279-285, 1997.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. PLoS Neglected Tropical Diseases, USA, v. 3, p. 1-11, 2016.

CHRETIEN, J. P. et al. Global Climate Anomalies and Potential Infectious Disease Risks: 2014-2015. PLoS Currents, USA, v.1, p. 1-20, 2015.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

CORRÊA, P. R. L. et al. Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 39, p. 33-40, 2005.

COPASA – COMPANHIA DE SANEAMENTO DE MINAS GERAIS. Informações sobre abastecimento. 2015. Disponível em: <<http://www.copasa.com.br/wps/portal/internet/imprensa/noticias/informacoes-sobre-abastecimento/>> Acesso em 18 de set. 2015.

COSTA, C. A. et al. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 42, p. 677-681, 2009.

COSTA, F. et al. Diversity of containers and buildings infested with *Aedes aegypti* in Puerto Iguazú, Argentina. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 28, p. 1802-1806, 2012.

DGS/PT – DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE DE PORTUGAL. Surto de dengue na Ilha da Madeira - situação em 3 de março de 2013. 2013. Disponível em: <https://www.dgs.pt/ficheiros-de.../dengue-madeira-situacao-em-2013_03_03-pdf.aspx/> Acesso em 08 de jun. 2016.

DIALLO, M. et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerging Infectious Diseases Journal*, USA, v. 9, p. 362-367, 2003.

DUARTE, E. H. et al. *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) em algumas ilhas de Cabo Verde: Tipologia dos criadouros e sua relação com a presença larval. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 80, p. 359-362, 2013.

DUNCOMBE, J. et al. Spatiotemporal patterns of *Aedes aegypti* populations in Cairns, Australia: assessing drivers of dengue transmission. *Tropical Medicine & International Health*, USA, v. 18, p. 839-849, 2013.

ESTALLO, E. L. et al. Weather Variability Associated with *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Dengue Vector) Oviposition Dynamics in Northwestern Argentina. *PLoS One*, USA, v. 10, p. 1-11, 2015.

FANTINATTI, E. C. S. et al. Abundância e Agregação de Ovos de *Aedes aegypti* L. e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no Norte e Noroeste do Paraná. *Neotropical Entomology*, Paraná, v. 36, 2007.

FARNESI, L. C. et al. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, p. 124-126, 2009.

FERREIRA, B. J. et al. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 14, p. 961-972, 2009.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 345-358.

FOCKS, D. A. et al. Dynamic life table model for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): analysis of the literature and model development. *Journal of Medical Entomology, USA*, v. 30, p. 1003-1017, 1993.

FOCKS, D. A. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. 2003. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/TDR_IDE_DEN_03.1.pdf> Acesso em 16 de dez. 2014.

FONSECA, D. M. et al. Density-dependent oviposition by female *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) spreads eggs among containers during the summer but accumulates them in the fall. *Journal of Medical Entomology, USA*, v. 7, 2015.

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

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

FOUQUE, F. et al. Epidemiological and entomological surveillance of the co-circulation of DEN-1, DEN-2 and DEN-4 viruses in French Guiana. *Tropical Medicine & International Health, USA*, v. 9, p. 41-46, 2004.

FREITAS, R. M.; RODRIGUES, C. S.; ALMEIDA, M. C. M. Estratégia Intersectorial para o Controle da Dengue em Belo Horizonte (Minas Gerais), Brasil. *Saúde e Sociedade, São Paulo*, v. 20, p. 773-785, 2011.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor Manual de Normas Técnicas. 2001. Disponível em <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf> Acesso em 23 de ago. 2013.

GLASSER, C. M.; GOMES, A. C. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública, São Paulo*, v. 36, p. 166-172, 2002.

GLASSER, C. M. et al. Comportamento de formas imaturas de *Aedes aegypti*, no litoral do Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, v. 44, p. 349-355, 2011.

GOMES, A. C. et al. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of São Paulo, Brazil. *Journal of Vector Ecology, USA*, v. 28, p. 74-78, 2003.

GONÇALVES, C. M. O estudo da competência vetorial das populações de *Aedes aegypti* da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais ao Dengue virus 2. Belo Horizonte, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, 2010.

GONÇALVES, C. M. et al. Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. *Parasite & Vectors*, London, v. 320, p. 1-8, 2014.

GUBLER, D. J. et al. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene*, USA, v. 27, p. 581-589, 1978.

GUBLER, D. J. et al. Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. *The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene*, USA, v. 30, p. 1094-1099, 1981.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Journal of Clinical Microbiology*, USA, v. 11, p. 480-196, 1988.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Org.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, 1997. p. 1-22.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 10, p. 100-103, 2002.

GUEDES, D. R. D. Análise da competência vetorial para o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco. Recife, 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2012.

GURUKUMAR, K. R. et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology Journal*. USA, v. 6, p. 10, 2009.

GUY, B. et al. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, Ananindeua, v. 2, p. 51-64, 2011.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, Washington, v. 239, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, 1997. p. 23-44.

HALSTED, S. B. Dengue. *Lancet*, London, v. 307, p. 1644-1652, 2007.

HAMMON, W. M. et al. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. *Science*, USA, v. 131, p. 1102-1103, 1960.

HARDY, J. L. et al. Mosquitoes as carriers of viral diseases. *California Agriculture Online*, California, v. 34, p. 8, 1980.

HAYDEN, M. H. et al. Microclimate and human factors in the divergent ecology of *Aedes aegypti* along the Arizona, US/Sonora, MX Border. *EcoHealth*, New York, v. 7, p. 64-77, 2010.

HAWLEY, W. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, California, v. 4, p. 1-39, 1988.

HOUNG, H. S. et al. Development of a Fluorogenic RT-PCR System for Quantitative Identification of dengue Virus Serotypes 1-4 Using Conserved and Serotype-Specific 3'noncoding Sequences. *Journal of Virological Methods*, USA, v. 95, p. 19-32, 2001.

HOWE, G. M. A world geography of human diseases. Academic Press, New York, 1977.

HUGHES, J. H.; PORTER, J. E. Dispersal of mosquitoes through transportation with particular reference to immature stages. *Mosquito News*, USA, v. 16, p. 106-111, 1956.

IBARRA, A. M. S. et al. Dengue Vector Dynamics (*Aedes aegypti*) Influenced by Climate and Social Factors in Ecuador: Implications for Targeted Control. *PLoS One*, USA, v. 8, p. 1-11, 2013.

IBARRA, S. A. M. et al. A social-ecological analysis of community perceptions of dengue fever and *Aedes aegypti* in Machala, Ecuador. *BMC Public Health*, London, v. 14, 2014.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Cidades@*. 2012. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>> Acesso em 27 de ago. 2012.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Estações Automáticas. 2010. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo.php?QTUyMQ==> Acesso em 22 de dez. 2010.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Estações Automáticas. 2011. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo.php?QTUyMQ==> Acesso em 20 de dez. 2011.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Normais Climatológicas. 2012a. Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>> Acesso em 27 de ago. 2012.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Estações Automáticas. 2012b. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo.php?QTUyMQ==> Acesso em 13 de dez. 2012.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Estações Automáticas. 2013. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo.php?QTUyMQ==> Acesso em 10 de dez. 2013.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Estações Automáticas. 2014. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo.php?QTUyMQ==> Acesso em 30 de dez. 2014.

JOHNSON, B. W. et al. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology, USA*, v. 43, p. 4977-4983, 2005.

KNUDSEN, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia, Roma*, v. 37, p. 91-97, 1995.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantification of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods, Philadelphia*, v. 138, p. 123-130, 2006.

KOW, C. Y. et al. Detection of Dengue Viruses in Field Caught Male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by Type-Specific PCR. *Journal of Medical Entomology, USA*, v. 38, p. 475-479, 2001.

KRAMER, L. D.; EBEL, G. D. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Advances in Virus Research, USA*, v. 60, p. 187-232, 2003.

KRAMER, M. U. G. et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data, USA*, v. 35, 2015.

KUHN, R. J. et al. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell, USA*, v. 108, p. 717-725, 2002.

LAMBRECHTS, L. et al. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases, USA*, v. 4, p. e646, 2010.

LAMBRECHTS, L.; FAILLOUX, A. B. Biology prospects in dengue research. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 107, p. 1080-1082, 2012.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology, USA*, v. 30, p. 545-551, 1992.

LEE, H. L.; ROHANI, A. Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. *Dengue Bulletin, Asia*, v. 29, p. 106-111, 2005.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *Journal of Clinical Virology, Netherlands*, v. 45, p. 61-66, 2009.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Org.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Org.). Fields Virology. Philadelphia: Edition Lippincott-Raven Publishers, 2007.

LOPES, T. F. et al. Laboratory evaluation of the development of *Aedes aegypti* in two seasons: influence of different places and different densities. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, v. 56, p. 369-374, 2014.

MACIEL, I. J. et al. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. *Revista de Patologia Tropical, Goiás*, v. 37, p. 111-130, 2008.

MARTINS, V. E. et al. Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, v. 43, p. 73-77, 2010.

MARTINS, V. E. P. et al. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One, USA*, v. 7, p. e41386, 2012.

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

MCSHERRY, J. A. Some medical aspects of Darien schema: was it dengue? *Scottish Medical Journal, Scotland*, v. 27, p. 183-184, 1982.

MENDONÇA, F. A. et al. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. *Sociedade e Natureza, Uberlândia*, v. 21, p. 3, 2009.

MILLER, M. J.; LOAIZA, J. R. Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* across Panama—Implications for Control of Dengue and Chikungunya Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases, USA*, v. 8, p. 1-7, 2015.

MITCHELL, C. J. Vector competence of North and South America Strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses. *Journal of American Mosquito Control Association, USA*, v. 7, p. 446-451, 1991.

MOREIRA, L. A. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell, USA*, v. 139, p. 1268-1278, 2009.

MORRISON, A. C. et al. Evaluation of a sampling methodology for rapid assessment of *Aedes aegypti* infestation levels in Iquitos, Peru. *Journal of Medical Entomology, USA*, v. 41, p. 502-510, 2004.

MOURA, A. J. F. et al. Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. *Parasite & Vectors, United Kingdom*, v. 8, p. 114, 2015.

MOUREAU, G. et al. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne and Zoonotic Diseases, USA*, v. 7, p. 467-477, 2007.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Cartilha da Dengue. 2010. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html> Acesso em 05 de ago. 2013.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue clássica 2012 e 2013. 2013. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_classica_2012_at032013.pdf> Acesso em 05 de ago. 2013.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz. Vacina Fiocruz-GSK deverá proteger contra os 4 sorotipos. 2014a. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=219&sid=3>> Acesso em 05 de nov. 2014.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico Volume 45. 2014b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/outubro/27/BE-2014-45--26---Dengue-SE41-e-CHIKV-SE42.pdf>> Acesso em 05 de nov. 2014.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica (SE) 41 e febre de chikungunya até a SE 42 de 2014. 2014c. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/outubro/27/BE-2014-45--26---Dengue-SE41-e-CHIKV-SE42.pdf>> Acesso em 05 de dez. 2014.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. 2015. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/29/2015-035---Dengue-SE-40---29.10.15.pdf>> Acesso em 17 de nov. 2015.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 16. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/17/2016-016---Dengue-SE16-publica---o.pdf>>. Acesso em 08 jun. 2016.

MUKHOPADHYAY, S. et al. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 3, p. 13-22, 2005.

NATAL, D. et al. Encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em Bromeliaceae na periferia de São Paulo, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 31, p. 517-518, 2002.

NDIAYE, P. I. et al. Rainfall triggered dynamics of *Aedes* mosquito aggressiveness. *Journal of Theoretical Biology*, Europe, v. 243, p. 222-229, 2006.

NIESTERS, H. G. Clinical virology in real time. *Journal of Clinical Virology*, Netherlands, v. 25, p. 3-12, 2002.

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

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Dengue case classification. 2009. Disponível em <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>> Acesso em 23 de mar. 2014.

OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Saúde nas Américas. Washington: [s. n.], 2007.

PAINGANKAR, M. S. et al. Monitoring of dengue and chikungunya viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Surat city, India. *Current Science*, Índia, v. 106, p. 1559-1567, 2014.

PASSOS, R. A. et al. Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 37, p. 729-734, 2003.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Combate à Dengue – 2010. 2010. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=19502&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&> Acesso em 01 jun. 2013.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Combate à Dengue – 2011. 2011. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=22811&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&> Acesso em 01 jun. 2013.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Combate à Dengue – 2012. 2012a. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=27040&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&> Acesso em 01 jun. 2013.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Clima em Belo Horizonte. 2012b. Disponível em: <<http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/contents.do?evento=conteudo&idConteudo=24221&chPlc=24221&termos=clima>> Acesso em 21 ago. 2012.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Distritos Sanitários de Belo Horizonte. 2012c. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=16010&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&> Acesso em 19 jun. 2012.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Combate à Dengue –2013. 2013. Disponível em <http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saudef&tax=34838&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&> Acesso em 02 de abr. 2013.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Combate à Dengue –2014. 2014. Disponível em <http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saudef&tax=34838&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&> Acesso em 07 de nov. 2014.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Meio Ambiente – Gestão de Áreas Verdes. 2015a. Disponível em <http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=meioambiente&lang=pt_BR&pg=5700&tax=38428> Acesso em 24 de jan. 2015.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. LIRAa de Outubro de 2015. 2015b. Disponível em <<http://www.pbh.gov.br/smsa/dengue/pag.php?p=2>> Acesso em 28 de dez. 2015.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. PBH/SLU/Coleta de Resíduos. 2015c. Disponível em <http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=slu&tax=34898&lang=pt_BR&pg=5600&taxp=0&> Acesso em 24 de jan. 2015.

PBH – PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. LIRAa. 2016. Disponível em <http://www.pbh.gov.br/smsa/dengue/balanco_dengue.php> Acesso em 03 de mai. 2016.

PENNA, M. L. F. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 19, p. 305-309, 2003.

PESSANHA, J. E. M. et al. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 44, p. 103-105, 2011.

PESSANHA, J. E. M. et al. Diffusion pattern and hotspot detection of dengue in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Tropical Medicine, USA*, p. 1-11, 2012.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, 2002.

PINHEIRO, V. C. S. et al. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse-transcription polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, p. 833-839, 2005.

PIOVEZAN, R. et al. Spatial evaluation of larvae of Culicidae (Diptera) from different breeding sites: application of a geospatial method and implications for vector control. *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 56, p. 368-376, 2012.

POERSCH, C. O. et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *Journal of Clinical Virology*, Netherlands, v. 32, p. 272-277, 2005.

POLONI, T. R. R. S. Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real. Ribeirão Preto, 2009. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2009.

PONGSIRI, A. et al. Differential Susceptibility of Two Field *Aedes aegypti* Populations to a Low Infectious Dose of Dengue Virus. *PLoS One*, USA, v. 9, p. e92971, 2014.

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

PONTES, R. J. S. et al. Vector densities that potentiate dengue outbreaks in a Brazilian city. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, USA, v. 62, p. 378-383, 2000.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 108, p. 11-17, 2013.

RACE, M. W. et al. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 73, p. 18-22, 1979.

REZZA, G. *Aedes albopictus* and the reemergence of dengue. *BMC Public Health*, United Kingdom, v. 12, p. 1-3, 2012.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology Journal*, London, v. 174, p. 479-493, 1990.

ROSEN, L. Sexual transmission of dengue virus by *Aedes albopictus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, USA, v. 69, p. 446-447, 1987.

RUSSELL, P. K. et al. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: SCHLESINGER, R. W. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press, 1980. p. 503-529.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, USA, v. 7, p. 1-13, 2007.

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

- SANCHEZ-RODRÍGUEZ, O. S. et al. Natural Transmission of Dengue Virus by *Aedes albopictus* at Monterrey, Northeastern Mexico. *Southwestern Entomologist*, Washington, v. 39, p. 459-468, 2014.
- SCHOELER, G. B. et al. Evaluation of surveillance devices for monitoring *Aedes aegypti* an urban area of northeastern Peru. *Journal of American Mosquito Control Association*, USA, v. 20, p. 6-11, 2004.
- SERPA, L. L. N. et al. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, p. 1-5, 2006.
- SERPA, L. L. N.; KAKITANI, I.; VOLTOLINI, J. C. Competição entre larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, p. 479-484, 2008.
- SERPA, L. L. N. et al. Study of the distribution and abundance of the eggs of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* according to the habitat and meteorological variables, municipality of São Sebastião, São Paulo State. *Parasite & Vectors*, United Kingdom, v. 6, p. 321, 2013.
- SIM, S. et al. Dengue Virus Infection of the *Aedes aegypti* Salivary Gland and Chemosensory Apparatus Induces Genes that Modulate Infection and Blood-Feeding Behavior. *PLoS Pathogens*, USA, v. 8, 2012.
- SINAN – SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN Dengue online. Nova classificação de casos de dengue OMS. 2014. Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em 23 de mar. 2014.
- SIQUEIRA, A. L.; TIBÚRCIO, J. D. Estatística na área da saúde – Conceitos, metodologias, aplicações e prática computacional. Belo Horizonte: Coopmed, 2011.
- SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, USA, v. 11, p. 642-650, 2004.
- SOARES-DA-SILVA, J. et al. Variation in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae) infestation in artificial containers in Caxias, state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 45, p. 174-179, 2012.
- SOUZA, S. S. et al. Associação entre incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti*, no Estado de Goiás. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 43, p. 152-155, 2010.
- TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue e febre hemorrágica do dengue no Brasil: que tipo de pesquisas a sua tendência, vigilância e experiências de controle indicam ser necessárias? *Cader nos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, p. 1307-1315, 2005.
- TU, W. C. et al. Ultrastructural studies on the reproductive system of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with dengue 2 virus. *Journal of Medical Entomology*, USA, v. 35, p. 71-76, 1998.

UFMG – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Arrudas e Onça agravam situação do Rio das Velhas: Condições ambientais das sub-bacias refletem impacto da região metropolitana. Boletim das sub-bacias do Rio das Velhas. Belo Horizonte: UFMA, 2003.

URDANETA, L. 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. Genetics Selection Evolution, USA*, v. 5, p. 177-184, 2005.

VAREJÃO, J. B. M. et al. Criadouros de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, v. 38, p. 238-240, 2005.

VEZZANI, D.; SCHWEIGMANN, N. Suitability of containers from different sources as breeding sites of *Aedes aegypti* (L.) in a cemetery of Buenos Aires City, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 97, p. 789-792, 2002.

VILELA, A. P. P. et al. Dengue Virus 3 Genotype I in *Aedes aegypti* Mosquitoes and Eggs, Brazil, 2005–2006. *Emerging Infection Diseases journal, Atlanta*, v. 16, p. 6, 2010.

WERNER, D. et al. Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Eurosurveillance, Europe*, v. 17, 2012.

WILSON, M. E.; CHEN, L. H. *Dengue in the Americas*. Geneva: World Health Organization, 2002.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology, USA*, v. 5, p. 518-528, 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on Dengue. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2htm> Acesso em 15 de jul. 2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Impact of Dengue. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>>. Acesso em 23 de set. 2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em 08 de jun. 2016.

WOODRING, J. L. et al. *Biology of Disease Vectors*. In: MARQUARDT, W. C.; BEATY, B. J. (Org.). *Natural cycles of vector-borne pathogens*. Colorado: University Press of Colorado. 1996, p. 51-72.

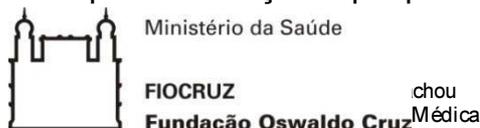
WYSE, A. P. P. *Modelo Matemático da Transmissão de Dengue*. *Biomatemática, São Paulo*, v. 21, p. 153-162, 2011.

YANG, H. M. et al. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti*, the vector of dengue. *Epidemiology & Infection, United Kingdom*, v. 137, p. 1188-1192, 2009.

ZEIDLER, J. D. et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and infestation dynamics in Roraima, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 42, p. 1-6, 2008.

Apêndices

Apêndice 1: Modelo de termo de autorização assinado pelo morador ou responsável pelo imóvel para a realização da pesquisa de campo.



Prezado Morador (a)/Responsável pelo Imóvel,

Sua casa foi selecionada para participar de uma pesquisa de monitoramento do mosquito da dengue, visando aprimorar as ações para o controle dessa doença. O projeto é coordenado pela doutoranda Juliana Maria Trindade Bezerra e tem como título “Monitoramento da circulação de Dengue vírus em mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em Belo Horizonte, Minas Gerais”, sob as orientações do Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta e da Dra. Nágila Francinete Costa Secundino. Para isso, será instalada na sua residência uma armadilha para captura de mosquitos adultos. Essa armadilha é acionada ao ser ligada em energia elétrica (127 volts). Esse serviço está sendo coordenado pela Fiocruz Minas Gerais – Ministério da Saúde (Centro de Pesquisas René Rachou), com a participação e colaboração da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte. Para tanto, queremos avisar-lhe que, durante o período de aproximadamente 36 meses, sua residência será visitada em dias úteis, semanalmente por um técnico da Fiocruz Minas Gerais e por um agente de endemias da Secretaria Municipal de Saúde, devidamente identificados e treinados, para verificar se a armadilha instalada capturou algum mosquito. A armadilha não possui substância tóxica, não atrairá mais mosquitos para o imóvel e nem irá interferir na rotina de sua casa, não trazendo malefícios para você e para os demais moradores.

Por meio deste termo, solicitamos seu consentimento para que essa atividade seja realizada no seu imóvel, por meio de sua assinatura em duas vias, ficando uma com você e a segunda com o pesquisador responsável. Em caso de desistência da visita do seu imóvel em algum momento da pesquisa, pedimos que nos avise com antecedência. Estamos disponíveis para qualquer esclarecimento pelos telefones (31) 33497735/33497736, inclusive ligações a cobrar.

Agradecemos a sua colaboração e atenção.

Responsável pelo imóvel/assinatura: _____

Endereço do imóvel: _____

 Juliana Maria Trindade Bezerra
 Doutoranda responsável pela pesquisa/FIOCRUZ-MG

 Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz, MG
 Avenida Augusto de Lima, 1715, 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brasil
 Telefones: (31) 33497735/33497736

E-mails: pimenta@cpqrr.fiocruz.br nagila@cpqrr.fiocruz.br juliana.bezerra@cpqrr.fiocruz.br

Apêndice 2: Artigo submetido à publicação.

Full title: First evidence of infected field-caught adult *Aedes albopictus* in a Brazilian dengue-endemic risk city: a four-year survey.

Short title: Infected *Aedes albopictus* in a dengue-endemic risk city.

Juliana MT Bezerra¹, Bárbara A Chaves², Evelyn BC Vaz², Raphaela GP Araújo¹, Fabrício F Melo¹, Caroline M Gonçalves¹, Breno M Silva³, Luciana D Silva⁴, Silvana T Brandão⁵, Douglas Norris⁶, Nágila FC Secundino^{1#}, Paulo FP Pimenta^{1#*}

¹Medical Entomology Laboratory, René Rachou Research Centre – FIOCRUZ-MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ²Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil, ³Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, ⁴Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵Belo Horizonte Secretary of Health, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ⁶Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins Malaria Research Institute, Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA.

* Correspondent Author: Dr. Paulo FP Pimenta, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima, 1715, CEP 30190-002, Belo Horizonte, M.G. Brazil. *E-mail: pimenta@cpqrr.fiocruz.br

#The two last authors contributed equally to this work.

Abstract

Brazil reported the majority of the dengue cases in Americas during the last two decades, where the occurrence of human dengue cases is exclusively attributed to the *Aedes aegypti*. Nowadays, other recognized Dengue virus (DENV) vector in Asian countries, *Ae. albopictus*, has been detected in more than half of the 5,565 Brazilian municipalities. Therefore, the aim of the present study was to investigate the possible the presence of, and determine the infected

field-caught adult *Ae. albopictus* populations in a dengue-endemic risk city of Belo Horizonte, Minas Gerais State's capital, in four consecutive DENV transmission seasons. These mosquitoes were caught in three selected districts and all *Ae. albopictus* females were individually processed by real-time RT-PCR, to research the DENV presence. The first, third and fourth seasons and Pampulha and East districts had the highest medians of field-caught *Ae. albopictus*, respectively. The second season had the highest proportion of DENV-infected field-caught females. Our study shows for the first time that DENV-infected adult *Ae. albopictus* is circulating in a Brazilian dengue-endemic risk city besides the well-known proven vector, the *Ae. aegypti*. Further long-term studies are necessary to better understand the role of *Ae. albopictus* in DENV transmission and or its vectorial competence in endemic cities of Brazil and other countries of the American continent.

Key words: Dengue virus (DENV), field-caught *Aedes albopictus*, epidemic, population distribution, infection rate.

Introduction

Dengue is a tropical disease and the most important mosquito-vectorized viral infection of humans being, affecting many tropical and sub-tropical countries in Southeast Asia, the Pacific and the Americas. Approximately 50 million people are infected with dengue each year and, about 500,000 of them are hospitalized with dengue hemorrhagic fever, the severe form of the disease. In recent years, the annual average of dengue cases reported to the World Health Organization (WHO) has increased dramatically. In 2013, countries in the Americas reported more than 2.3 million cases of dengue, with 37,692 cases of severe dengue and 1,280 deaths, resulting in a mortality rate of about 0.05% [1, 2]. Brazil reported the majority of the dengue cases during the last two decades with 1,452,489 cases reported in 2013 [3].

Nowadays, dengue virus (DENV) transmission has been reported in all 27 Brazilian states [4]. The focus of this study was the endemic city of Belo Horizonte, capital of Minas Gerais State,

located in southeast Brazil with approximately 2.4 million inhabitants. In 1996, the first dengue cases were confirmed in the southeastern administrative region of the city. In the following years, the city has recorded thousands of autochthonous cases every year transforming the city in a dengue-endemic risk area. The recent and worst dengue epidemic in the city history was 2013 with 89,213 cases reported [5, 6, 7]. However, this epidemic can be overcome this year, 2016, since until March has been reported 36,172 cases according to the Belo Horizonte Secretary of Health [7].

Understanding the relationship between DENV and mosquito vectors is critical for epidemiological reasons. The primary dengue vector in the Americas is the *Aedes aegypti* mosquito. Nevertheless, in recent decades *Ae. albopictus*, the "Asian Tiger mosquito" native to Southeast Asia, has invaded most of the Americas, from the United States to Argentina [8]. At present, the colonization of *Ae. albopictus* has been confirmed in 19 countries [9, 10, 11]. *Aedes albopictus* is the main vector of DENV in rural and semi-urban tropical Asia and has caused small epidemics in Europe. This mosquito can also transmit the Flavivirus and the Alphavirus agents of yellow fever, West Nile, Chikungunya and Zika, [12, 13, 14, 15, 16]. Laboratory studies have shown that *Ae. albopictus* could be infected with more than 20 types of arboviruses, drawing attention to its broad vector competence, although its role in natural transmission is uncertain [17, 18]. Most relevant for our work, studies have shown that Brazilian populations of *Ae. albopictus* from both urban and rural areas, are susceptible to DENV infection in the laboratory [19, 20].

Government health authority-driven vector control programs are the only available tools for the control of dengue disease in much of the endemic world. There are currently no drugs or vaccines available to cure or prevent DENV infection in humans. The presence and the density of the primary vector *Ae. aegypti* usually determines the necessity for vector control actions during dengue epidemics. Oral infection experiments with the four serotypes

have also demonstrated that Asian *Ae. albopictus* are more susceptible to DENV infection than the “traditional” vector *Ae. aegypti* [21, 22, 18]. Even though *Ae. albopictus* has successfully invaded much of the Americas, its role in DENV transmission is not well defined, despite laboratory studies that have found that *Ae. albopictus* can be successfully infected by all DENV serotypes [23, 24]. In contrast to *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* is not considered a target by governmental programs for dengue vector control in American countries.

A recent study provided the first geographical distribution of *Ae. albopictus* in Brazil at the municipal level with the mosquito being detected in more than half of all Brazilian municipalities (59.0%) [11]. The highest reported HI (house index) values are in municipalities and states located in the southeast [11]. Its presence and broad distribution in Brazilian dengue endemic cities has never been correlated with dengue epidemics. Even so, the discovery of DENV-infected larvae of *Ae. albopictus* in the Brazilian states of Minas Gerais, Pernambuco, Ceará and Roraima, located respectively in the southeast, northeast and west of the country, has drawn attention [25, 26, 27, 28]. Martins and collaborators bred *Ae. albopictus* adults derived from field-caught larvae infected with DENV in Fortaleza city, the capital city of the Northeast State of Ceará [29]. This fact has raised the level of concern even further since it was indicative of occurrence of natural vertical transmission of DENV in *Ae. albopictus*.

The goal of this study was to investigate the presence and distribution of the mosquito *Ae. albopictus* as well as check their infection by DENV. *Aedes albopictus* were collected across four consecutive DENV transmission seasons in a Brazilian dengue-endemic risk city. The data presented here illustrates that *Ae. albopictus* should be taken into account in future studies aimed at understanding dengue transmission dynamics and in developing effective strategies for dengue vector control in large urban settings.

Materials and Methods

Study Area

This research was conducted in the Brazilian city of Belo Horizonte, capital of Minas Gerais State, located at latitude 19°49'01", longitude 43°57'21" and altitude 858 m above sea level. The city has an area of 331,400 km², with a population of 2,375,151 inhabitants and population density of 7,167.02 inhab./km² [30]. The climate is tropical to subtropical with a marked dry season, with temperatures ranging from 18.0°C to 23.0°C and an annual average of 21.1°C. The DENV transmission season occurs mainly in the summer [32]. *Aedes albopictus* were caught in three selected districts, which had been reported in the previous ten years as having high mosquito densities by the City Health Department and a high concentration of dengue cases during epidemic seasons [5, 6, 7]. Sixty collection locations were randomly selected using the MapInfo Professional 2009 version 10.0 (MapInfo®, USA) program based on the city map of selected districts.

Mosquito collection

Adult female *Ae. albopictus* were caught during the DENV transmission seasons (October from one year to May of the following year) in the four-year study period (2010 to 2014). There were no collections in the dry-winter seasons (June to September) when the presence of mosquitoes is not detectable in the city. BG-Sentinel Full Version® traps (Biogents AG, Germany) were used to collect adult host-seeking mosquitoes. The BG-Sentinel trap is considered a gold standard instrument for the detection, capture and surveillance of the *Ae. albopictus* mosquito [33, 34, 35, 36] including in Asian countries where this species is the natural main vector of DENV [37]. A single trap was placed at twenty peri-domestic locations in each of the three selected districts, making a total of 60 trap locations for the study. The 60

traps were placed on Mondays and the mosquitoes were collected in 24 h time-intervals on Tuesdays, Wednesdays and Thursdays of each week across the four DENV transmission seasons of this study. On each collection day, mosquitoes were individually separated into tubes, the collection date, species, district, and detailed trap location recorded, and specimens stored at -70°C for subsequent molecular analyses. All individual field-caught mosquitoes classified as *Ae. albopictus* were checked for their GPS-district location, quantified, visually checked for absence of blood meal and analyzed for DENV infection.

Experimental infection

One hundred field-caught adults *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* both from endemic areas were used as control of our method for DENV infection detection as well as to compare their infection rates (IR). Briefly, the mosquitoes were infected with DENV-1 via a glass-feeding device covered with a skin of young *Gallus domesticus*. A mixture comprising 2/3 of blood mouse (*Mus musculus*) and 1/3 of DENV infected C6/36 cell suspension was added to the glass feeders and offered to the mosquitoes as described elsewhere [38]. One hour after feeding, only fully engorged females were separated in cages and maintained with 10% glucose solution ad libitum until the 14th day after experimental infection, time necessary for completion of the extrinsic incubation period.

Detection of DENV by real-time RT-PCR (qPCR)

All field-caught mosquitoes were carefully re-checked under a stereoscope to confirm the species identification and the absence of blood meal. RNA extraction and DENV detection by real-time RT-PCR were conducted as previously reported [38]. In brief, whole bodies of field-

caught mosquitoes were macerated individually in 1.5 mL conical tubes in 200 µl PBS. After centrifugation, 140 µl of the supernatant was processed for RNA extraction using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen®, Venlo, Limburgo) according to the manufacturer's instructions. DENV detection was performed by real-time RT-PCR in an ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR machine using the Power SYBR® Green RNA-to-C_T[™] 1-Step system (Applied Biosystems, California, USA) as described in details elsewhere [38]. The 3' non-coding region primers, B1-forward (5' -AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA-3') and B2-reverse (5' -CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT-3'), used in this study were designed based on the study of Leparc-Goffart et al. (2009) [39] with minor modifications. All analyses were performed in duplicate and in parallel with standardized samples (to provide standard curves), positive controls and negative controls. Results indicative of DENV presence in each mosquito were obtained as previously described [38] using a standard curve and analyzing the melting curve for specificity of the amplified products (melting point ~78.6°C) and C_T of 35, according to rigorous criteria from literature for The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) [40].

Infection Rate and Evaluation of Relative Abundance

The infection rate (IR) was calculated as the proportion (percentage) of mosquitoes in which DENV was detected by qRT-PCR and it was related to the total quantity of specimens caught in each DENV transmission season and/or each district. The relative abundance (RA) of *Ae. albopictus* was calculated by comparing the number of field-caught *Ae. albopictus* in distinct districts. In contrast, the RA of DENV-infected *Ae. albopictus* was calculated by comparing the quantity of infected and non-infected mosquitoes [38].

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to evaluate whether the data were normally distributed. The asymptotic Pearson's Chi-square test and the Kruskal-Wallis test were used to compare percentages and medians, respectively. In all tests, the significance level to reject the null hypothesis was 5%. The database of this study was prepared using Microsoft Excel 2007 software and data analyzes were performed using the statistical package GraphPad Prism version 5.3 (La Jolla, CA, USA).

Results

The field-caught *Ae. albopictus* relative abundance (RA) by DENV transmission season and by districts.

Field-caught *Ae. albopictus* mosquitoes collected during the four-year study period totaled the amount of 511 female individuals. The field-caught *Ae. albopictus* quantity and percentage across the DENV transmission seasons were extremely variable: 22.8% (n = 117) in the first season, 8.6% (n = 44) in the second season, 39.1% (n = 199) in the third season and 29.5% (n = 151) in the fourth season. There was difference in the medians of field-caught females among the seasons ($p < 0.0001$): the first, the third and the fourth had the highest medians when compared to the second ($p < 0.0001$, to each comparison) (Table 1).

The field-caught *Ae. albopictus* RA varied by district: 234 (45.9%) in Pampulha; 99 (19.3%) in the North; and 178 (34.8%) in the East. There was difference in the medians of field-caught females among the districts ($p < 0.0001$) since Pampulha ($p < 0.0001$) and East ($p < 0,05$) had the highest medians when compared to the North (Table 1).

Table 1. The field-caught *Aedes albopictus* relative abundance (RA) by seasons and districts.

Collection Season	District			
	N (%)			
	Pampulha*	North	East*	All districts
1 st	67 (57.3)	22 (18.8)	28 (23.9)	117 (100.0)
2 nd	17 (38.7)	13 (29.5)	14 (31.8)	44 (100.0)
3 ^{rd*}	89 (44.8)	49 (24.6)	61 (30.6)	199 (100.0)
4 th	61 (40.5)	15 (9.9)	75 (49.6)	151 (100.0)
Total	234 (45.9)	99 (19.3)	178 (34.8)	511 (100.0)

N (%), number and percentage of field-caught *Ae. albopictus*. * $p < 0.0001$.

The field-caught *Ae. albopictus* infection rate (IR) by DENV transmission season and by districts.

Across the consecutive DENV transmission seasons the IR was 15.4% corresponding the amount of 79 DENV-infected females of the 511 field-caught *Ae. albopictus*. However, there was a significant difference in the proportions of field-caught DENV-infected *Ae. albopictus* when assessed season-by-season. The second season had the highest proportion with 84% field-caught infected *Ae. albopictus* when compared the four-transmission seasons ($p < 0.05$) (Table 2). There was no significant difference among the proportions of infected *Ae. albopictus* (IR) when comparing the collection districts ($p = 0.98$) (Table 2).

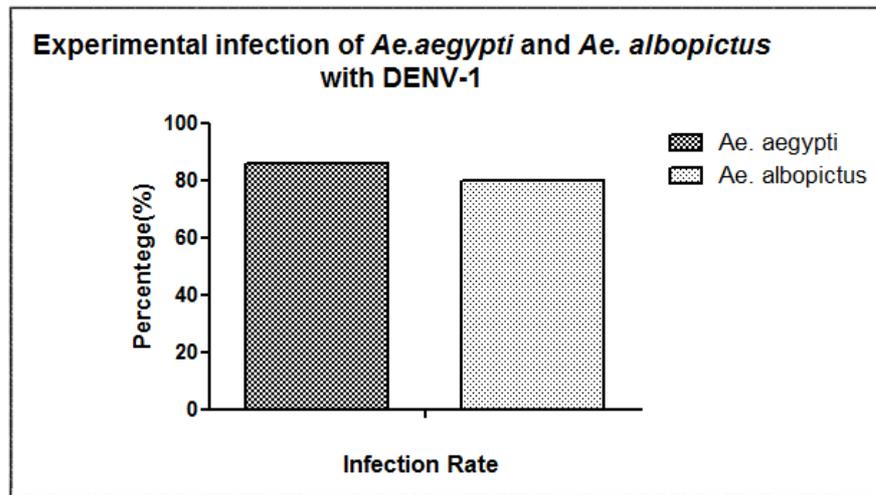
Table 2. The field-caught *Aedes albopictus* infection rate (IR) by seasons and districts.

Collection Season	District			
	Pampulha	North	East	All districts
	IF/CF (IR%)	IF/CF (IR%)	IF/CF (IR%)	IF/CF (IR%)
1 st	14/67 (20.8)	9/22 (40.9)	3/28 (10.7)	26/117 (22.2)
2 ^{nd*}	15/17 (88.2)	11/13 (84.6)	11/14 (78.5)	37/44 (84.0)
3 rd	3/89 (3.3)	4/49 (8.1)	4/61 (6.5)	11/199 (5.5)
4 th	1/61 (1.6)	0/15 (0.0)	4/75 (5.3)	5/151 (3.3)
Total	33/234 (14.1)	24/99 (24.2)	22/178 (12.3)	79/511 (15.4)

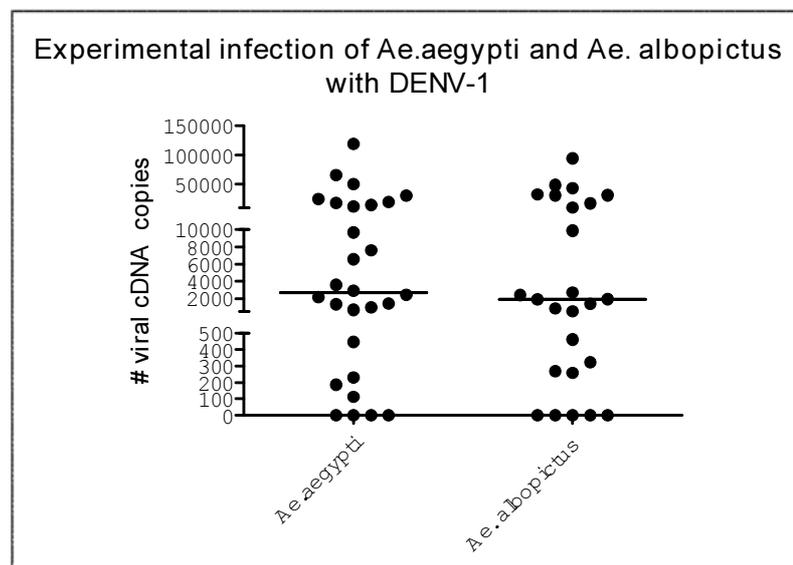
IF, DENV-infected females; CF, collected females; IR, infection rate (proportion of IF of the CF, multiplied by 100.0%). *p < 0.05.

Comparative infection rate (IR) of the field-caught specimens of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* experimentally infected with DENV.

Comparative analysis showed similarities in the characteristics related to experimental DENV infections of field-caught specimens of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*. The infection rates (IR) of the *Ae. aegypti* was 85.7% while the *Ae. albopictus* was 80% with no significant differences ($p = 0,541$) (Graphic 1). The infection profiles were also very similar between the groups of the two species of mosquitoes. The median numbers of DENV viral copies of *Ae. aegypti* was 2689,7 (ranged from 114,1 to 118908,5) and in relation to *Ae. albopictus* the median was 1910,497 (ranged from 259,7 to 94105,1) (Graphic 2).



Graphic 1. Experimental DENV infections of field-caught specimens of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*.



Graphic 2. Median numbers of DENV viral copies of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*.

Discussion

Currently, *Ae. albopictus* has been detected in different Brazilian municipalities [11]. *Aedes albopictus* has gradually occupied positions in the urban environment of the large cities, as already established by the *Ae. aegypti* [43]. Nevertheless, the occurrence of human dengue cases is exclusively attributed to the *Ae. aegypti* and the exact role of *Ae. albopictus* in the DENV transmission is not already defined. In order to observe the distribution and possible DENV infection of field-caught *Ae. albopictus*, we selected three districts

(Pampulha, North and East), which historically had the highest epidemiological impact of dengue epidemics in the city of Belo Horizonte. During four consecutive DENV transmission seasons, 48,862 (45.6%) of the total of citywide human dengue cases ($n = 106,961$) were identified in these districts [41] where we make our collections of *Ae. albopictus*. These three evaluated districts are situated in urban areas of Belo Horizonte, characterized by high human population density and vast human-built features (houses, commercial buildings, hospitals, schools, paved roads, bridges and municipal parks).

In our investigation, the major quantity of *Ae. albopictus* collected in all of the three districts evaluated, occurred in traps installed near green areas during the four collection seasons (data not described in this article). Actually, most of the specimens were collected in the Pampulha district during the third season. The Pampulha district has one of the largest green areas of the capital, corresponding to 300,000 m², where is situated a large ecological park [30, 31]. It is already known that *Ae. albopictus* is preferentially found in transitional urban-suburban areas that are closer to parks and woodlands [44]. It is noteworthy that during the fieldwork, independently of the districts evaluated, in the first and in the second seasons, *Ae. albopictus* specimens were detected only in a few traps. Conversely, this situation was completely changed in the third and fourth seasons, when 199 and 151 mosquitoes were captured in the traps, respectively. The difference in the amounts of *Ae. albopictus* verified among districts and seasons is probably occasioned by environmental factors such as space organization associated to climatic variables and it needs further investigation.

Across the consecutive DENV transmission seasons it was detected the presence of field-caught DENV-infected *Ae. albopictus* in all districts. Although there was no difference among the proportions of field-caught DENV-infected *Ae. albopictus* when comparing the collection districts, we found a significant difference when they were evaluated season-by-season. The second season was marked by the highest frequency of DENV-infected *Ae.*

albopictus, which achieved the IR value of 84.0%. Conversely, it is interesting to note that the largest number of dengue human cases in the city occurred in the four season when there was the lowest IR (3.3%) of DENV-infected *Ae. albopictus* [8]. Further investigation should be developed in order to better understand the relationship between DENV-infected *Ae. albopictus* and human dengue cases including considering the presence of DENV-infected *Ae. aegypti*, the traditional main vector. In general during epidemic episodes in other countries, compared with *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* is considered less effective as a dengue vector [8], although this species is recognized as the main DENV vector in Japan and Taiwan [47] and in Macao and Hawaii [48]. However, it is important to consider our experimental DENV infection findings showing similar high IRs suggestive of equal vector competence of field-caught *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*.

In conclusion, our study shows for the first time that DENV-infected adult *Ae. albopictus* is circulating in a Brazilian dengue-endemic risk city besides the well-known proven vector, the *Ae. aegypti*. Based on the findings described above, *Ae. albopictus* mosquito deserves vigilance as a DENV vector that can increase its importance due to its adaptation and colonization of new endemic areas. It is also crucial to keep in mind that this mosquito can become a bridge between wild and urban cycles of yellow fever and other arboviruses in Brazil, considering its ability to be in wild, rural, suburban and urban environments [8, 9, 45]. Additionally, *Ae. albopictus* has been also associated with Chikungunya and Zika arboviruses in Central Africa and Italy [49, 50]. Further long-term studies are necessary to better understand the role of *Ae. albopictus* in DENV transmission and other arboviruses in endemic-risk cities of Brazil and other countries of the American continent.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge and dedicate this work to two recently deceased colleagues for their contribution to understanding dengue epidemics in the Americas and their significant contribution to this study. (1) Jorge Arias a former PAHO-WHO fellow who established the MS and PhD programs in the National Institute of Amazon Research – INPA and (2) José Eduardo Marques Pessanha an epidemiologist who led the Vector Control Program of the Municipal Health Secretariat of Belo Horizonte.

We acknowledge the major financial support by The Bill & Melinda Gates Foundation (OPPGH5332) and the funds supplemented by the following Brazilian agencies: Foundation of the Institute Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Strategic Programme for Supporting Health Research (PAPES), Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Thematic Programme of Support to Centers of Excellence (PRONEX Dengue Network), Science Without Borders Program (project #400704/2014-5), Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG) and Amazonas State Research Support Foundation (FAPEAM).

Author Contributions

JB, DO, RA, CG, BA carried out the mosquito collections, participated in the RNA extraction detections by real-time RT-PCR and analysis of the infection rate and relative abundance. JB, LS, and FM performed the statistical analysis. PP, NS, BS, SB and DN and participated in the

design of the study and analysis the results. PP, DN and NS conceived of the study and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. World Health Organization (WHO). Dengue cases. 2014. Available: http://www.wpro.who.int/mediacentre/factsheets/fs_09032012_Dengue/en/webcite
2. Pan American Health Organization (PAHO). Dengue. 2014. Available: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734
3. Ministério da Saúde (MS). Boletim da dengue. 2013. Available: <http://portal.saude.sa.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Dengue-classica-at---2013.pdf>
4. Ministério da Saúde (MS). Boletim da dengue. 2015. Available: <http://portal.saude.sa.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/25/2015-006---Boletim-Dengue-SE06-2015.pdf>
5. Prefeitura de Belo Horizonte (PBH). Combate a Dengue. 2013. Available: http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=sau de&tax=34838&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&
6. Prefeitura de Belo Horizonte (PBH). Combate a Dengue. 2010. Available: http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=sau de&tax=19502&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&
7. Prefeitura de Belo Horizonte (PBH). Combate a Dengue. 2015. Available: <http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/files.do?evento=download&urlArqPlc=boletim-gvsi-dengue.pdf>
8. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ (2010) Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for DENV Transmission. *PLoS* 4: 1–9.
9. Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Bortel WV (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks and control options. *Vector-Borne Zoo Dis* 12: 435–447.
10. Lima-Camara TN, Codeço CT, Honório NA, Bruno RV, Peixoto AA, Lounibos LP (2013) Male accessory gland substances from *Aedes albopictus* affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: S18–S25.
11. Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA (2014) Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 787–796.
12. Hawley WA (1988) The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 1: 1–39.
13. World Health Organization (WHO). Dengue. 2006. Available: http://www.who.int/whr/2006/whr06_en.pdf
14. Delatte H, Paupy C, Dehecq JS, Thiria J, Failloux AB, Fontenille D (2008) *Aedes albopictus*, vecteur des virus du chikungunya et de la dengue à la Réunion: biologie et contrôle. *Parasite* 15: 3–13.
15. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D (2009) *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11: 1177–1185.

16. Tomasello D, Schlagenhauf P (2013) Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. *Travel Med Infect Dis* 11: 274–284.
17. Gubler DJ, Rieter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA (2001) Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Env Health Perspec* 109: 223–233.
18. Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M, Failloux A (2013) High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya and Dengue Viruses in the Southeast of France. *PLoS One* 18. Available: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059716>
19. Castro MG, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenço-de-Oliveira R (2004) 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* 99: 809–814.
20. Fernandes Z, Moncayo A, Forattini OP, Weaver SC (2004) Susceptibility of urban and rural populations of *Aedes albopictus* from Sao Paulo State, Brazil, to infection by dengue-1 and – 2 viruses. *J Med Entomol* 41: 961–964.
21. Rudnick A, Chan YC (1965) Dengue type 2 virus in naturally infected *Aedes albopictus* mosquitoes in Singapore. *Science* 149: 638–639.
22. Richards SL, Anderson SL, Alto BW (2012) Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for Dengue Virus in the Florida Keys. *J Med Entomol* 49: 942–946.
23. Xiao-Xia G, Xiao-Juan Z, Chun-Xiao L, Yan-De D, Ying-Mei Z, Dan X, Rui-De X, Cheng-Feng Q, Tong-Yan Z (2013) Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for DEN2-43 and New Guinea C virus strains of dengue 2 virus. *Acta Trop* 128: 566–570.
24. Mutsuo K, Osamu K, Mayuko Y, Yoshihide M, Kimio H, Toshihiko H, Naoko N, Sahiro Y, Yoshio T, Kyoko S (2014) Retrospective search for dengue vector mosquito *Aedes albopictus* in areas visited by a German traveler who contracted dengue in Japan. *Inter J Infect Dis* 26: 135–137.
25. Pessanha JEM, Caiaffa WT, Cecilio AB, Iani FCM, Araujo SC, Nascimento JC, Kroon EG, Proietti FA, Arias JR (2011) Cocirculation of two DENV serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 103–105.
26. Antunes MN, Silva CH, Guimarães MCS, Rabaco MHL (2014) Monitoramento de informação em mídias sociais: o e-Monitor Dengue. *Trans Informação* 26: 9–18.
27. Deiningner LSC, Lucena KDT, Figueiredo DCMM, Silva CC, Oliveira AEC, Anjos UU (2014) A sala de situação da dengue como ferramenta de gestão em saúde. *Saúde deb* 38: 50–56.
28. Villela EFM, Natal D (2014) Mídia, saúde e poder: um jogo de representações sobre dengue. *Saúde soc* 23: 1007–1017.
29. Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, Guedes MI (2012) Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One* 7: e41386. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405123/>
30. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Cidades – Belo Horizonte. 2014. Available: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>
31. Prefeitura de Belo Horizonte (PBH). Clima em Belo Horizonte. 2015. Available: <http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/contents.do?evento=conteudo&idConteudo=24221&chPlc=24221&termos=clima>
32. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Normais Climatológicas. 2014. Available: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>

33. Williams CR, Long SA, Webb CE, Bitzhenner M, Geier M, Russell RC, Ritchie SA (2007) *Aedes aegypti* population sampling using BG-Sentinel traps in north Queensland Australia: statistical considerations for trap deployment and sampling strategy. *J Med Entomol* 44: 345–350.
34. Werner D, Kronefeld M, Schaffner F, Kampen H (2012) Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Eurosurveillance* 17. Available: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20067>
35. Crepeau TN, Healy SP, Bartlett-Healy K, Unlu I, Farajollahi A, Fonseca DM (2013) Effects of Biogents Sentinel Trap Field Placement on Capture Rates of Adult Asian Tiger Mosquitoes, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 8: 1–7.
36. Farajollahi A, Kesavaraju B, Price DC, Williams GM, Healy SP, Gaugler R, Nelder MP (2009) Field efficacy of BG-Sentinel and industry-standard traps for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and West Nile virus surveillance. *J Med Entomol* 46: 919–925
37. Unlu I, Farajollahi A (2014) A multiyear surveillance for *Aedes albopictus* with Biogents Sentinel trap counts for males and species composition of other mosquito species. *J Am Mosq Control Assoc* 30: 122–125.
38. Gonçalves CM, Melo FF, Bezerra JMT, Chaves BA, Silva BM, Silva LD, Pessanha EM, Arias JR, Secundino NFC, Norris DE, Pimenta PFP (2014) Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. *ParasVect* 320: 1–8.
39. Leparç-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, Tuiskunen A, Moureau G, Charrel R, de Lamballerie X (2009) Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *J Clin Virol* 45: 61–66.
40. Bennett KE, Olson KE, Muñoz ML, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, Black WC, Beaty BJ (2002) Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg* 67: 85–92.
41. Prefeitura de Belo Horizonte (PBH): Combate a Dengue – 2011. [http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=22811&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&]
42. Prefeitura de Belo Horizonte (PBH). Combate a Dengue. 2012. Available: http://portal.pbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=27040&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&
43. Pessoa MVE, Silveira DA, Cavalcante IL, Florindo MI (2013) *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. *Entomotropica* 28: 75-86.
44. Rezza G (2012) *Aedes albopictus* and the reemergence of dengue. *BMC Pub* 12: 1–3.
45. Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.
46. Glasser CM, Gomes AC (2002) Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. *Rev Saúde Pública* 36: 166-172.
47. Hotta S (1998) Dengue vector mosquitoes in Japan: the role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the 1942- 1944 dengue epidemics of Japanese Main Islands. *Med Entomol Zool* 49: 276-284.
48. Almeida AP, Baptista SS, Sousa CA, Novo MT, Ramos HC, Panella NA, Godsey M, Simões MJ, Anselmo ML, Komar N, Mitchell CJ, Ribeiro H (2005) Bioecology and vectorial capacity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Macao, China, in relation to dengue virus transmission. *J Med Entomol* 42: 419-428.

49. Pages F, Peyrefitte CN, Mve MT, Jarjaval F, Brisse S, Iteman I, Gravier P, Nkoghe D, Grandadam M (2009) *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. *PLoS One* 4: e4691. Available: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004691>
50. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, Cordioli P, Angelini P, Venturelli C, Meriardi G, Dottori M (2008) Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis* 14: 852-853.

Anexo

Anexo 1. Dados complementares ao artigo científico apresentado na Tese de Doutorado.

Estes dados referem-se ao trabalho desenvolvido pela doutoranda Bárbara Aparecida Chaves, da Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical. Abaixo, descrição resumida da pesquisa realizada, com respectivos objetivo, métodos, resultados, e referências descritos no artigo científico (Apêndice 2).

1 Objetivo

Verificar a taxa de infecção de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* de uma mesma região para o Dengue virus 1 (DENV-1).

2 Métodos

2.1 Manutenção dos mosquitos

Foram feitas coletas de ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* utilizando armadilhas de oviposição (ovitampas) em um mesmo local, no município de Manaus, Estado do Amazonas. A armadilha para coletar ovos para o *Ae. aegypti* foi colocada em um ambiente mais antropizado e para coletar a segunda espécie, as armadilhas foram instaladas próximas da vegetação. Estes ovos foram cultivados em laboratório até que as espécies chegassem à fase adulta, com temperatura controlada entre 26 e 28°C. Os adultos foram mantidos em gaiolas e alimentados com solução de glicose a 10% e alimentação sanguínea em camundongos.

3 Células e vírus

3.1 Cultura de células

Células de linhagem contínua de larvas de *Ae. albopictus* foram gentilmente cedidas pelo Dr. Cláudio Antônio Bonjardim (ICB/UFMG). Estas células foram cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15), contendo 20 µg/ml de gentamicina, 5 µg/ml de anfotericina B, 200U/ml de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) e permaneceram a 28°C em B.O.D., para passagens do vírus. Para os repiques das células, o sobrenadante foi desprezado e as células

foram lavadas duas vezes com PBS 1X (tampão fosfato salina). Utilizou-se tripsina para desprendê-las da monocamada. Após soltas e homogeneizadas acrescentou-se sobre as células repicadas um novo meio L 15.

3.2 Vírus

A cepa viral utilizada para os experimentos de infecção dos mosquitos foi a DENV-1/SPH, isolada a partir de soro de um paciente com dengue em São José do Rio Preto, São Paulo, em 2011. As amostras foram gentilmente cedidas pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Os vírus foram multiplicados em células C6/36 de *Ae. albopictus* em estufa à 25°C e mantidos em freezer à -70°C.

A titulação viral foi calculada pelo método TCID₅₀ (REED; MUENCH, 1938). Para a realização deste procedimento células C6/36 foram cultivadas em placas de 96 poços com meio L 15 e SFB a 1%, sendo implantadas 2,5 x 10⁵ células/poço.

3.3. Infecção de Mosquitos

Amostras de 300 fêmeas de cada espécie, da geração F2 tiveram a alimentação açucarada suspensa 24 horas antes da alimentação sanguínea infectante por membrana. Foi utilizado alimentador artificial revestido com membrana animal dissecada da pele de *Gallus domesticus* (um dia de idade). Para alimentação dos mosquitos foi usado sangue de camundongo previamente inativado adicionado a 1/3 do volume final de suspensão viral, depositado dentro do alimentador, e este permaneceu aquecido com água circulante vinda de um banho-maria a 40°C. As fêmeas ingurgitadas foram separadas e alimentados com glicose a 10% até o 14º dia após a ingestão do sangue infectado por DENV-1, tempo necessário para o vírus completar seu ciclo de vida no mosquito e chegar até a glândula salivar (SALAZAR et al., 2007).

3.4 Extração de RNA Viral

Os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram macerados em tubos cônicos de 1,5 mL DNase/RNase free, com auxílio de pistilo plástico e macerador Pellet Pestle[®] Motor (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, Missouri), em 200 µL de Tampão Salina Fosfato (Phosphate Buffered Saline – PBS). Após centrifugação por 15 segundos a 8.000 rpm, 140 µL do sobrenadante foram processados para extração do RNA viral com a utilização do QIAamp[®] Viral RNA mini Kit (Qiagen[®], Venlo, Limburgo) de acordo com as orientações do fabricante. Logo após a extração, as amostras com RNA extraído, foram acondicionadas em freezer a -70°C, para análises moleculares posteriores.

3.5 RT-PCR em Tempo Real

Para realização da RT-PCR em Tempo Real foi utilizado o kit Power SYBR[®] Green RNA-to-C_T[™] 1-Step (Applied Biosystems[®], Califórnia, Estados Unidos). Os iniciadores usados para todos os DENV foram:

c) Primer Forward: 5'-AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA-3' ;

d) Primer Reverse: 5'-CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT-3'.

Esses iniciadores foram desenhados a partir de sequências completas dos quatro sorotipos de DENV, de sequências parciais do capsídeo e da região 3' não-codificadora de DENV4, isoladas em diferentes áreas geográficas do mundo, de acordo com Leparc-Goffart et al. (2009).

3.6 Análise estatística

O Teste de Qui-quadrado de Pearson foi utilizado para comparar as porcentagens das taxas de infecção entre os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. O nível de significância adotado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%. O banco de dados deste estudo foi preparado usando o software Microsoft Excel 2007 e as análises de dados foram realizadas com o pacote estatístico GraphPad Prism versão 5.3 (La Jolla, CA, EUA).

4 Resultados

A análise comparativa mostrou semelhanças nas características relacionadas com as infecções experimentais de espécimes pelo DENV-1, capturados em campo, de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. A taxa de infecção do *Ae. aegypti* foi de 85,7 %, enquanto para o *Ae. albopictus* foi de 80%, sem diferenças significativas ($p = 0,541$). O número médio de cópias

virais de cDNA de DENV de *Ae . aegypti* foi 2689,7, variando de 114,1 a 118908,5. Em relação ao *Ae. albopictis* número médio foi de 1910,497, variando de 259,7 a 94105,1 . Os perfis de infecção também foram muito semelhantes entre os grupos das duas espécies de mosquitos.

Referências

LEPARC-GOFFART, I. et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *Journal of Clinical Virology, Netherlands*, v. 45, p. 61-66, 2009.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Medicine and Hygiene, USA*, v. 27, p. 493-497, 1938.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, v. 7, p. 1-13, 2007.

