

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

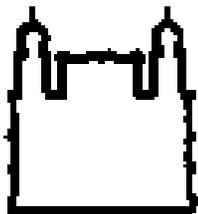
**AVALIAÇÃO MULTICÊNTRICA DE ASPECTOS DA  
CAPACIDADE VETORIAL DE POPULAÇÕES DE  
*Aedes aegypti* DO PERU QUANTO AO VÍRUS DENGUE DO  
SOROTIPO 2**

**MIRIAM GRACIELA PALOMINO SALCEDO**

**Rio de Janeiro**

**2013**





MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

Miriam Graciela Palomino Salcedo

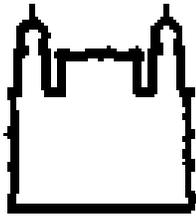
Avaliação multicêntrica de aspectos da capacidade vetorial de populações de  
*Aedes aegypti* do Peru quanto ao vírus dengue do sorotipo 2

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

RIO DE JANEIRO

2013



**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical**

**Miriam Graciela Palomino Salcedo**

**AVALIAÇÃO MULTICÊNTRICA DE ASPECTOS DA CAPACIDADE VETORIAL DE  
POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* DO PERU QUANTO AO VIRUS DENGUE DO  
SOROTIPO 2**

**Orientador: Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira**

**Aprovada em: 27 de Setembro de 2013**

**Banca Examinadora**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Maria Ribeiro Nogueira - IOC/FIOCRUZ - **Presidente****

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tamara Nunes de Lima-Camara - PROCC/FIOCRUZ**

**Prof. Dr. José Bento Pereira Lima - IOC/FIOCRUZ**

**Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior - IOC/FIOCRUZ – Revisor/relator**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fatima dos Santos – Ministério da Saúde**

Rio de Janeiro, Setembro de 2013

2013

Trabalho realizado nos Laboratórios de Transmissores de Hematozoários e de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) na Fundação Oswaldo Cruz e no Laboratório de Entomologia do Centro Nacional de Salud Publica (CNSP) no Instituto Nacional de Salud (INS/Peru) sob a orientação do Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, com o apoio da Cooperação Internacional UNASUL do governo Brasileiro (CRIS/Fiocruz), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## DEDICATÓRIA

A meus filhos, pelo amor e compreensão,  
meu marido, meus pais, irmãs e irmãos pelo incentivo e apoio  
e meus sobrinhos pelo carinho,

## AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a meu orientador, professor Ricardo Lourenço de Oliveira pela confiança depositada em mim durante estes anos, pela orientação e conselhos.

À Marcia Goncalves de Castro pela amizade, apoio, orientação e colaboração durante o desenvolvimento do estudo.

À Nildimar Honório pela amizade, orientação e paciência na revisão do manuscrito da dissertação.

À Maria Goretti pela amizade e paciência na apresentação do manuscrito.

À Flavia Barreto pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento do estudo.

À André Barbosa, Mauro, Keli, Annyeli, Andiarina, Marcelo, Marcelo Quintela, Renato, Ignez, Cristiane, Jackeline, Fernanda, Priscila, Jose Zeca pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento do estudo.

À Omaira Vera pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento do estudo e na revisão do manuscrito da dissertação.

À Rafael Maciel de Freitas pela doação das armadilhas de oviposição para a coleta das populações de *Aedes aegypti*.

À Célio pela orientação na utilização da câmara umida para a embriogénese dos ovos de *Ae. aegypti*.

Aos amigos do laboratório LATHEMA, Teresa, Monique, Gabriel, Taisa e Roberto pela convivência e amizade.

À Martha Suárez pela amizade e apoio durante o desenvolvimento do estudo.

À meus chefes do INS/Peru, César Cabezas, Pedro Valencia, Manuel Céspedes, Manuel Espinoza, Lely Solari, Elizabeth Sánchez pela confiança

depositada em mim durante estes anos e pelo apoio em tudo o tempo de meu mestrado.

À meus companheiros do laboratório de Entomología-CNSP-INS/Peru, Jorge Valle, Jesus Pinto, Norma García, Walter León, Leonardo Mendoza, Gloria Diaz, Carmen Sinti e Pablo Villaseca pela amizade e colaboração na coleta das populações de *Ae. aegypti* do Peru e apoio durante o desenvolvimento do estudo.

À Maria Paquita García do laboratório de Arbovirus-CNSP-INS/Peru pela doação da amostra do vírus dengue sorotipo 2 para o desenvolvimento do estudo.

Enfim, a todos aqueles que de maneira direta contribuíram na realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tabelas .....	xii
Siglas e Abreviaturas .....	xiv
Resumo .....	xvi
ABSTRAC .....	xvii
1. Introdução .....	1
1.1. Breve histórico da dengue .....	3
1.2. Vírus dengue .....	4
1.3. Transmissão .....	7
1.4. Ciclos de Transmissão de dengue.....	9
1.5. Vetor .....	11
1.6. Dengue nas Américas.....	15
1.7. Dengue no Peru.....	18
1.8. Competência vetorial .....	24
2. Objetivo geral .....	29
2.1. Objetivos específicos: .....	29
3. Material e Métodos.....	30
3.1. Descrição das características epidemiológicas das áreas de estudo .....	30
3.2. Populações de <i>Ae. aegypti</i> e amostras de vírus DENV-2.....	39
3.2.1. Amostragem de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> nas diferentes localidades .....	39
3.2.2. Amostras de vírus utilizadas .....	42
3.3. Infecção dos mosquitos por via oral .....	43
3.4. Detecção e titulação do vírus DENV-2 em mosquitos infectados experimentalmente.....	44
3.4.1. Determinação da taxa de disseminação do vírus no mosquito através RT-PCR	45

3.4.2.	Titulação do vírus DENV-2 em cabeças de mosquitos infectados experimentalmente, por RT-PCR quantitativo, sistema TAQMAN (qRT-PCR) .....	49
	Meio de cultura de células .....	52
	Tampão Salina Fosfato (Phosphatase Buffer Salt – PBS). PBS pH 7,2 .....	52
	ATP ( <i>Adenosine Triphosphato</i> ).....	53
	Tampão TBE 10X* .....	53
	Gel de agarose 1% em TBE 0,5X.....	53
3.5.	Testes de susceptibilidade e/ou resistência á inseticida nos mosquitos adultos.....	54
3.6.	Testes estatísticos .....	56
4.	RESULTADOS.....	57
4.1.	Densidade de <i>Ae. aegypti</i> nas diferentes regiões climáticas e fitogeográficas do Peru com distintos históricos epidemiológicos de dengue. ....	57
4.1.1.	Variáveis climáticas.....	57
4.1.2.	Densidade de <i>Ae. aegypti</i> das localidades de estudo .....	59
4.1.3.	Índices de positividade das ovitrampas (IPO) .....	61
4.1.4.	Índice de densidade de ovos (IDO) de <i>Ae. aegypti</i> segundo a localidade peruana. ....	63
4.1.5.	Produtividade na coleta de ovos de <i>Ae. aegypti</i> por tipo de suporte instalado na armadilha de oviposição (ovitrampa) .....	66
4.2.	Avaliação da competência vetorial de populações peruanas de <i>Aedes aegypti</i> com DENV-2 isolado do Peru.....	69
4.2.1.	Seleção e titulação das amostras de DENV-2 isoladas do Peru e do Brasil para fines de infecção experimental de <i>Ae. aegypti</i> .....	69
4.2.2.	Obtenção das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> destinadas aos experimentos de determinação da competência vetorial. ....	70
4.2.3.	Taxas de disseminação de DENV-2 procedente do Peru em populações peruanas de <i>Ae. aegypti</i> .....	72
4.2.4.	Título viral na cabeça de fêmeas peruanas de <i>Ae. aegypti</i> em que houve disseminação de DENV-2 procedente do Peru. ....	75
4.3.	Competência vetorial comparativa de <i>Ae. aegypti</i> procedente do Peru expostos oralmente a DENV-2 isolados do Peru e do Brasil.....	77
4.4.	Testes de avaliação de susceptibilidade a inseticidas em <i>Ae. aegypti</i> peruanos. ....	80
5.	Discussão .....	85

5.1.	Densidade de <i>Ae. aegypti</i> nas diferentes regiões climáticas e fitogeográficas do Peru com distintos históricos epidemiológicos de dengue .....	85
5.1.1.	Ovitrapas com dois tipos de suporte .....	87
5.2.	Competência vetorial de populações peruanas de <i>Ae. aegypti</i> para DENV-2 do Peru.....	88
5.3.	Competência vetorial comparativa de uma população peruana de <i>Ae. aegypti</i> frente a amostras de DENV2 que circulam no Peru e no Brasil.....	97
5.4.	Perfis de resistência a inseticidas de populações peruanas de <i>Ae. aegypti</i> no Peru versus competência vetorial. ....	100
5.5.	Considerações finais.....	104
6.	Conclusões .....	109
7.	Perspectivas .....	111
8.	Referências bibliográficas .....	113

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Áreas geográficas com risco de transmissão e expansão de dengue. (Fonte: Adaptado de Bhatt et al. (2013); disponível em: [http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/fig\\_tab/nature12060\\_F2.html](http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/fig_tab/nature12060_F2.html))...2
- Figura 2.** (A) Vírus dengue (DENV). Adaptado de Perera e Kuhn, 2008. (B) Organização do genoma do vírus dengue. Regiões 5' e 3' não codificantes e a fase aberta de leitura indicando três proteínas estruturais (cápside (C), membrana (M) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de Guzman et al 2010. ....5
- Figura 3.** Principais mosquitos vectores (vermelho) e hospedeiro primatas não-humanos (preto) envolvidos no ciclo de transmissão silvestre e urbano de dengue. Adaptado de Hanley et al. (2013). TOT: Transmissão vertical. ....10
- Figura 4.** Número de casos de dengue nas Américas, 1980 – 2010. Fonte: (Adaptado de Brathwaite et al. 2012). ....18
- Figura 5.** Distribuição de *Ae. aegypti* nas Américas, nas décadas de 1930, em 1970 depois da campanha da erradicação e ano de 2004, após três décadas da campanha. Fonte: DJ Gubler, 2004. Copyright © 2004 Elsevier Ltd. ....19
- Figura 6.** Distribuição geográfica do *Ae. aegypti* por distritos no Peru, ano 2010. Fonte: DIGESA 2010. ....20
- Figura 7.** Taxa de incidência de dengue por 100.000 habitantes e sorotipos envolvidos (DENV 1 – 4), no Peru, 1990-2012. Fonte: DGE-MINSA, 2012.....23
- Figura 8.** Mapa de distribuição de sorotipos de dengue (DENV 1-4) por departamentos do Peru. A: 2010; B: 2011; C: 2012. Instituto Nacional de Salud-MINSA, 2012.....24
- Figura 9.** Mapa das regiões fito-geográficas do Peru. (A) costa, (B) selva alta e (C) Amazônia. Fonte: INRENA-PERU. ....31
- Figura 10.** Temperaturas extremas e pluviosidade de região da costa: (a) Estação Mallares (Piura) e (b) Estação Puerto Pizarro (Tumbes), Peru. Fonte: SENAMHI, estações de coordenadas da localização geográfica mais próxima das áreas do estudo. ....32
- Figura 11.** Temperaturas medias extremas e pluviosidade de região da selva alta (a) Estação Bagua Chica (Amazonas) e (b) Estação Satipo (Junin), Peru. Fonte:

SENAMHI, estações de coordenadas de localização geográfica mais próxima das áreas de estudo. ....33

**Figura 12.** Temperaturas médias extremas e pluviosidade de região da Amazônia: (a) Estação Puerto Almendras (Loreto) e (b) Estação Puerto Maldonado (Madre de Dios), Peru. Fonte: SENAMHI, estações de coordenadas de localização geográfica mais próxima das áreas de estudo. ....34

**Figura 13.** Número de ovos de *Ae. aegypti* por ovitrampa nas 12 localidades peruanas amostradas, na primavera de 2011 e outono de 2012. NR: Não foram usadas armadilhas; as coletas foram feitas com obtenção de larvas e pupas em criadouros. Boxplot indicando mediana (linha horizontal). Os asteriscos e bolas indicam observações discrepantes. ....65

**Figura 14.** Taxa de disseminação (porcentagem de mosquitos com RNA viral detectado na cabeça através de RT-PCR) em seis populações peruanas de *Ae. aegypti* e na cepa Paea (controle de infecção), oralmente expostas ao DENV-2 procedente do Peru, examinadas no 14° d.p.i. ....74

**Figura 15.** Quantificação da carga viral de DENV-2 originários do Peru em números de cópias de RNA em homogenato da cabeça (Log 10) de mosquitos peruanos e a da cepa Paea de *Ae. aegypti* no 14° d.p.i. ....76

**Figura 16.** Taxa de disseminação (porcentagem de mosquitos com vírus detectados em amostras de cabeça) em mosquitos *Ae. aegypti* da população peruana de Punchana e da cepa Paea, oralmente expostos a DENV-2 isolados do Peru (DENV-2 Pe) e do Brasil (DENV-2 Br), aos 14° e 21° d.p.i. ....78

**Figura 17.** Quantificação da carga viral de DENV-2 Pe e DENV-2 Br em números de cópias de RNA na cabeça de mosquitos *Ae. aegypti* da população peruana de Punchana e da cepa Paea, N=quantidade de amostras analisadas, correspondendo ao número de indivíduos em que houve disseminação viral, ao 14° e 21° d.p.i. ....79

**Figura 18.** Percentual de mortalidade de populações peruanas de *Ae. aegypti* com dose diagnóstica (10 µg/bot) e tempo até 60 minutos para alfacipermetrina. BAI: Buenos Aires, LCU: La Curva, PM7: Puerto Maldonado 7, PM9: Puerto Maldonado 9, e cepa controle de susceptibilidade Rockefeller (ROCK) ....82

**Figura 19.** Percentual de mortalidade de populações peruanas de *Ae. aegypti* com dose diagnóstica (10 µg/bot) e tempo até 60 minutos para deltametrina. BAI: Buenos Aires, LCU: La Curva, PM7: Puerto Maldonado 7, PM9: Puerto Maldonado 9, e cepa controle de susceptibilidade Rockefeller (ROCK). ....83

**Figura 20.** Percentual de mortalidade de populações peruanas de *Ae. aegypti* com dose diagnóstica (50 µg/bot) e tempo até 60 minutos para malation. BAI: Buenos Aires, LCU: La Curva, PM7: Puerto Maldonado 7, PM9: Puerto Maldonado 9, e cepa controle de susceptibilidade Rockefeller (ROCK) .....84

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Weaver & Vasilakis (2009) .....	6
<b>Tabela 2.</b> Características geográficas e dados de população das localidades. ....	35
<b>Tabela 3.</b> Tipo de reservatórios mais comumente encontrados com formas imaturas, índice de infestação larvária por <i>Ae. aegypti</i> e percentual de casa como fornecimento de água por localidade em 2011 – 2012.....	37
<b>Tabela 4.</b> Sorotipos, casos e óbitos por dengue reportados nos anos 2011 – 2012 nas regiões e departamentos onde foram feitos os estudos, no Peru.....	38
<b>Tabela 5.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos DENV .....	46
<b>Tabela 6.</b> Iniciadores utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan TM) aplicados ao DENV-2 (Johnson et al. 2005).....	49
<b>Tabela 7.</b> Valores de temperatura máxima e mínima, de temperatura média e de precipitação total obtidas nas estações meteorológicas mais próximas das localidades onde foram realizadas as coletas de mosquitos no Peru, registradas durante os dias em que foram instaladas as armadilhas ou coletadas larvas ou pupas, no período de novembro e dezembro de 2011 e maio e julho de 2012.....	58
<b>Tabela 8.</b> Amostras de <i>Ae. aegypti</i> provenientes de 12 localidades, coletadas na primavera de 2011 e no outono de 2012 com armadilhas de oviposição. ....	60
<b>Tabela 9.</b> Índice geral de positividade de ovitrampas para ovos de <i>Ae. aegypti</i> segundo a localidade e estação de amostragem, primavera de 2011 e no outono de 2012, no Peru. ....	62
<b>Tabela 10.</b> Índices de densidade de ovos de <i>Ae. aegypti</i> em 12 localidades peruanas, nas estações da primavera de 2011 e do outono 2012. ....	64
<b>Tabela 11.</b> Densidade de ovos de <i>Ae. aegypti</i> por tipo de suporte usado na armadilha, em 12 localidades peruanas, nas estações da primavera de 2011 e do outono 2012.....	67
<b>Tabela 12.</b> Ovitrapas positivas para ovos de <i>Ae. aegypti</i> por tipo de suporte usado na armadilha, em 12 localidades peruanas, nas estações da primavera de 2011 e do outono 2012.....	68

<b>Tabela 13.</b> Titulação de vírus DENV-2 de Peru e Brasil, obtidos de casos clínicos e de mosquito no Laboratório de Flavivírus, após sucessivas passagens em cultura de células <i>Ae. albopictus</i> clone C6/36. ....	69
<b>Tabela 14.</b> Número de <i>Ae. aegypti</i> adultos, fêmeas e machos, da geração F0 obtida nas respectivas localidades e que deram origem à colônia de onde foram amostrados os indivíduos empregados nos experimentos de infecção oral com vírus dengue. ....	71
<b>Tabela 15.</b> Taxas de disseminação, em ordem crescente, de DENV-2 procedente do Peru em populações peruanas de <i>Ae. aegypti</i> examinadas 14 dias após serem oralmente expostas ao vírus. O número de fêmeas examinadas acha-se entre parêntesis .....	73
<b>Tabela 16.</b> Taxa de disseminação (porcentagem de mosquitos com RNA viral na cabeça a través de RT-PCR) em <i>Ae. aegypti</i> de Punchana e da cepa Paea (controle de infecção), oralmente expostas a dois isolados virais originários do Peru e do Brasil, no 14° e 21 d.p.i.....	78
<b>Tabela 17.</b> Taxa de mortalidade de segunda geração (F2) de populações de <i>Ae. aegypti</i> de diferentes localidades das regiões da costa e amazônia de Peru, coletadas entre novembro e dezembro de 2011, registradas após exposição durante 30 minutos (tempo diagnóstico) a garrafas impregnadas com inseticida .....	81

## Siglas e Abreviaturas

ATP	do inglês <i>Adenosine Triphosphato</i>
C	Proteína estrutural do capsídeo do vírus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CNSP	Centro Nacional de Salud Publica-INS
Ct	do inglês <i>Cycle Threshold</i>
DC	Dengue clássico
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
DGE	Dirección General de Epidemiología-MINSA
DG	Dengue grave
DIGESA	Dirección General de Salud Ambiental-MINSA
Genoma	Genes que codificam uma poliproteína que depois é ORF
d.p.i	dias após a infecção
E	Gene que codifica a proteína E
ECP	Efeito Citopático
EIP	Período de Incubação Extrínseco
EUA	Estados Unidos de América
FHD	Febre hemorrágica da dengue
GPS	Global Positioning System
Hab/Km <sup>2</sup>	Habitantes / Kilometro <sup>2</sup>
INEI	Instituto Nacional de Estadística e Informática
INRENA	Instituto Nacional de Recursos Naturales
INS	Instituto Nacional de Salud-MINSA
kb	kilobase
MIB	do inglês <i>Midgut Infection Barrier</i>
MEB	do ingles <i>Midgut Escape Barrier</i>
MINSA	Ministerio de Salud-Peru

MID <sub>50</sub>	Concentração inibitória mínima 50%
msnm	Metros acima do nível do mar
NS	Proteína Não estrutural do vírus
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2A	Proteína não estrutural 2A
NS2B	Proteína não estrutural 2B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4A	Proteína não estrutural 4A
NS4B	Proteína não estrutural 4B
NS5	Proteína não estrutural 5
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	do Inglês <i>Open reading frame</i> (Cadeia aberta para leitura)
OPAS	Organização Panamericana da Saúde
PAHO	Pan American Health Organization
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PFU	Unidade formadora de placa
PrM	Proteínas estruturais Pré-membrana
qRT-PCR	RT-PCR em tempo real
RENACE	Red Nacional de Epidemiologia-DGE-MINSA
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SCD	Síndrome de choque da dengue
SIB	do Inglês <i>Salivary Gland Infection Barrier</i>
SEB	do Inglês <i>Salivary Gland Escape Barrier</i>
SENAMHI	Servicio Nacional de Meteriologia e Hidrologia del Peru-Ministerio del Ambiente
SSCP	do Inglês <i>Single Stranded Conformational Polymorphism</i>
TCID <sub>50</sub>	Dose Infecciosa pela Cultura de Tecido em células C636 ao 50%
ULV	Ultra-Baixo Volume
UR	Umidade Relativa

## Resumo

A incidência de dengue e a distribuição geográfica do seu vetor no Peru têm aumentado consideravelmente na última década, necessitando-se de avaliações locais acerca da dinâmica da sua transmissão visando ao aprimoramento do seu controle. O presente estudo consiste na primeira investigação multicêntrica de aspectos da capacidade vetorial de populações peruanas de *Ae. aegypti* quanto ao vírus dengue, incluindo avaliações simultâneas da densidade, da competência vetorial e do perfil de resistência a inseticidas em populações naturais desse vetor das três regiões fitogeográficas e climáticas no Peru: costa, selva alta e amazônia. Para tal, fizemos amostragens de *Ae. aegypti* em 12 localidades, na primavera de 2011 e outono de 2012, empregando ovitrampas com dois tipos de suporte: madeira e papel. Os mosquitos da geração F2 de seis localidades foram oralmente expostos a uma amostra de vírus dengue do sorotipo 2 isolada na Amazônia peruana, em 2011 (DENV-2 Pe), para se avaliar competência vetorial. Homogenatos da cabeça dos mosquitos foram examinados por RT-PCR 14 dias após o repasto infectante (d.p.i) para a determinação da taxa de disseminação viral. Quando positivos, efetuou-se a titulação viral na cabeça por qRT-PCR. Mosquitos de uma população Amazônica peruana, Punchana (PUN), foram comparativamente infectados com DENV2-Pe e com uma amostra do mesmo sorotipo e genótipo isolado no Brasil (DENV-2 Br), tendo sido examinados aos 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> d.p.i. com as mesmas técnicas. Também o perfil de resistência a três inseticidas foi determinado em mosquitos adultos de quatro localidades, através do teste de garrafas impregnadas com inseticidas. Não houve diferença entre os dois suportes usados nas ovitrampas quanto à eficiência na coleta de ovos. A densidade de mosquitos foi bastante heterogênea no tempo e espaço no país. A positividade de ovitrampas foi elevada, variando de 22,2% a 65,4%, sendo a maior registrada em PUN e a menor em La Curva (LCU), na costa, onde, por outro lado, encontrou-se a maior densidade de ovos por ovitrampa positiva (68,8), seguida por PUN (66,5%); a menor densidade foi verificada em Bagua Chica (30,1), na selva alta. Houve disseminação viral em mosquitos de todas as seis populações, com taxas heterogêneas, variando entre 6,7%, em LCU, na costa, e 53,3%, em Rio Negro (RNE) na selva alta. A mediana da carga viral foi de  $\sim 10 \log_{10}$  cópias de RNA/cabeça (PUN e Puerto Maldonado setor 7, na Amazônia, e Bagua Grande, na selva alta) e de  $\sim 5 \log_{10}$  RNA/cabeça (RNE, da selva alta, e LCU e Sanchez Cerro, da costa). A taxa de disseminação da infecção na população PUN foi menor para o DENV-2 Pe que para DENV-2 Br, tanto ao , no 14<sup>o</sup> d.p.i (16,7% versus 35,5%) quanto no 21<sup>o</sup> d.p.i. (20% versus 36,7%), embora a mediana da carga viral tenha sido maior na cabeça dos mosquitos infectados com o DENV-2 Pe. Três de quatro populações mostraram diferentes níveis de resistência para Alfacipermetrina, com mortalidade variando de 41,3% a 95,2%, todas apresentaram níveis de resistência incipiente para Deltametrina, mas foram sensíveis para Malation. Em conjunto, os resultados revelam que as populações de *Ae. aegypti* são consideravelmente competentes para a transmissão de dengue e apresentam-se em elevada densidade na maioria das localidades peruanas, sugerindo alto risco de ocorrência de epidemias de dengue, especialmente na amazônia. Ainda que possuam populações de *Ae. aegypti* competentes para transmitir o vírus dengue e com perda da susceptibilidade a piretroides, o risco de epidemias nas regiões da costa e selva alta é possivelmente ainda limitado por fatores climáticos e ecológicos.

## ABSTRACT

Dengue incidence and vector geographical distribution have considerably increased in the last decade in Peru. The assessment of factors concerned with local dengue transmission dynamics is required in order to improve control measures. The present study is the first multicenter investigation of some aspects of the vector capacity of Peruvian populations of *Ae. aegypti* to dengue virus, including simultaneous assessments of mosquito density, vector competence and profile of insecticide resistance in natural populations of this vector the three phytogeographic and climatic regions in Peru: the coast, mountain jungle Amazon. *Ae. aegypti* was sampled in 12 localities, during the spring 2011 and fall 2012, employing ovitraps with two types of support for mosquito egg laying: wooden paddle and towel paper. Mosquitoes of the F2 generation from six populations were orally exposed to a sample of dengue virus serotype 2 isolated in the Peruvian Amazon in 2011 (DENV-2 Pe), to assess vector competence. Head homogenates of mosquitoes were examined by RT-PCR 14 days after the infecting meal (dpi) for determining the rate of viral. When positive, the viral titer in the head was determined by qRT-PCR. Mosquitoes from one population from the Peruvian Amazon, Punchana (PUN), were comparatively exposed to DENV2 -Pe and to a strain of the same dengue virus serotype and genotype isolated in Brazil (DENV-2 Br), were examined at 14 and 21 dpi with the same techniques. The profile of resistance to three insecticides was determined in adult mosquitoes from four localities by the CDC bottle bioassay. The two kinds of support used in the ovitraps have similar efficiency in collecting *Ae. aegypti* eggs. Mosquito density was very heterogeneous in time and space in the country. The positivity of ovitraps was essentially high, ranging from 22.2 % to 65.4 %, with the highest and lowest recorded in PUN, in the Amazon, and La Curva, on the coast (LCU). On the other hand, the highest egg density per positive ovitrap ( 68.8 ), was detected in LCU, followed by PUN ( 66.5 % ); the lowest density was found in Bagua Chica ( 30.1 ), in mountain jungle. Dissemination of viral infection occurred in mosquitoes of all six tested populations, although with heterogeneous rates, ranging from 6.7% in LCU, on the coast, and 53.3 % in Rio Negro (RNE), in mountain jungle. The median viral load was  $\sim 10 \log_{10}$  RNA copies/head in PUN and Puerto Maldonado sector 7, the Amazon, and Bagua Grande, in mountain jungle, and  $\sim 5 \log_{10}$  RNA/head (RNE, the in mountain jungle, and LCU and Sanchez Cerro, the coast). Unexpectedly, the dissemination infection rates in the PUN population was lower for the DENV-2 Pe than the DENV-2 Br, both at the 14th d.p.i (16.7% versus 35.5%) and 21<sup>o</sup> d.p.i. (20% versus 36.7%), although median of viral loads were higher for the DENV-2 Pe strain. Three out of four populations displayed different levels of resistance to Alfacipermetrina, with mortality rates ranging from 41.3 % to 95.2 %. All populations showed developing levels of resistance to deltamethrin, but were all sensitive to Malathion. Together, results showed that *Ae. aegypti* populations are considerably competent to dengue transmission and occur in high densities in most assessed localities in Peru, suggesting high risk of dengue epidemics, especially in the Amazon. Even having *Ae. aegypti* populations competent to transmit dengue virus and with loss of susceptibility to pyrethroids, the risk of epidemics in the coast and mountain jungle regions is possibly still limited by climatic and ecological factors.

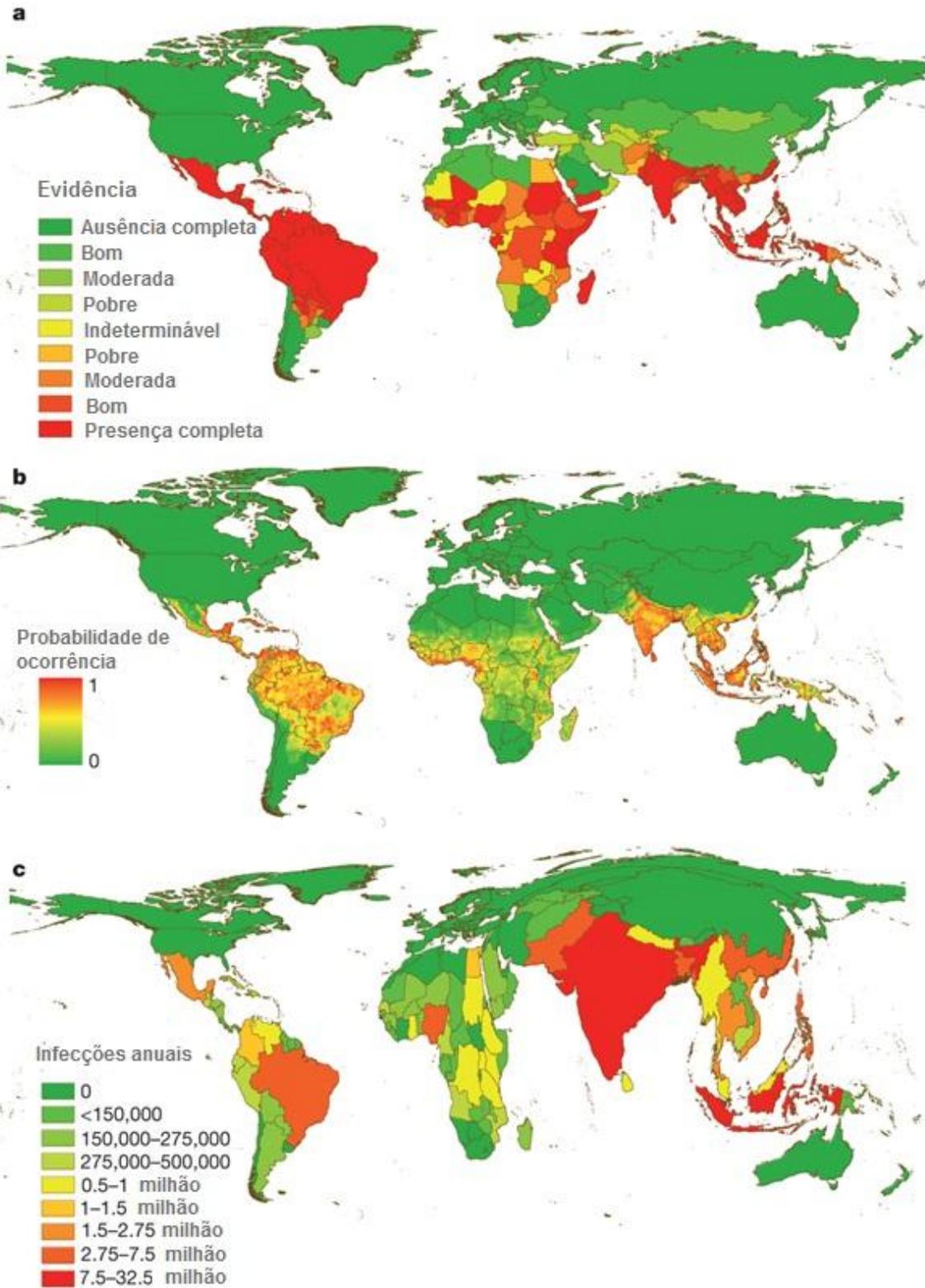
## 1. Introdução

O dengue é a mais importante infecção viral transmitida por artrópodes vetores aos humanos. No mundo, cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de adquirir a infecção, das quais cerca de 975 milhões vivem em áreas urbanas tropicais e subtropicais do Sudeste de Ásia, do Pacífico e das Américas (Figura 1). A transmissão também ocorre na África e no Mediterrâneo Oriental, aonde as comunidades rurais vêm sendo mais afetadas. Estima-se que mais de 50 milhões de infecções ocorrem a cada ano, incluindo 500.000 hospitalizações por febre hemorrágica da dengue (FHD), principalmente em crianças, com taxas de letalidade maior que 5% em algumas áreas (Martinez 2008; WHO 2009; Guzman et al. 2010). Recentemente, Bhatt et al. (2013) sugeriram que, na verdade, ocorrem cerca de 390 milhões de infecções por dengue, das quais 96 milhões resultam em casos assintomáticos, não detectados.

Os vetores naturais do vírus dengue (DENV) são mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*. Os principais vetores naturais de DENV no mundo são *Aedes aegypti* (Linnaeus) e *Aedes albopictus* (Skuse). As diferentes espécies de *Aedes* envolvidas na transmissão apresentam distintos níveis de competência vetorial e capacidade vetorial. Esses parâmetros também sofrem variação entre populações de uma mesma espécie transmissora e tais variações afetam a transmissão do vírus na natureza (Gubler & Kuno 1997).

Basicamente a intensidade da transmissão do dengue é fortemente influenciada pelos parâmetros que regem a capacidade vetorial de populações naturais de *Ae. aegypti*<sup>1</sup>. Entre estes citam-se a densidade dos mosquitos, a taxa de picada em humanos por dia, as taxas de sobrevivência diária, a duração do período de incubação extrínseco do vírus e a susceptibilidade oral ao DENV, ou seja, a competência vetorial (Bennett et al. 2002; Failloux et al. 2002; Luz et al. 2003; Lourenco-de-Oliveira et al. 2004; Maciel-de-Freitas et al. 2011), o tema central do presente estudo.

<sup>1</sup>Os nomes dos gêneros dos mosquitos foram abreviados, conforme (Reinert 1975).



**Figura 1.** Áreas geográficas com risco de transmissão e expansão de dengue. (Fonte: Adaptado de Bhatt et al. (2013); disponível em: [http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/fig\\_tab/nature12060\\_F2.html](http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/fig_tab/nature12060_F2.html)).

## 1.1. Breve histórico da dengue

O termo “dengue” provavelmente se originou nas Américas, entre 1827 e 1828, quando os pacientes acometidos, em uma epidemia no Caribe, apresentavam uma síndrome que incluía exantema e artralgia. Tratavam-se principalmente de negros escravos provenientes da África, que denominavam essa síndrome de dinga ou denga, homônimo do swahili “*Ki dinga pepo*”, que por sua vez significa pancada ou golpe dado por um mau espírito, provocando ataque doloroso semelhante à cãimbra (Halstead 1980; Gubler & Kuno 1997). No entanto, o mais antigo relato desta doença remota à Dinastia Chin (265-420 d.C), quando a doença era chamada de “veneno da água”, provável associação de insetos voadores provenientes da água. O termo já aparece formalmente em uma enciclopédia médica chinesa editado durante a Dinastia Tang (610 d.C), e a Dinastia Norte Sung (992 d.C) (Gubler & Kuno 1997; Gubler 1998a).

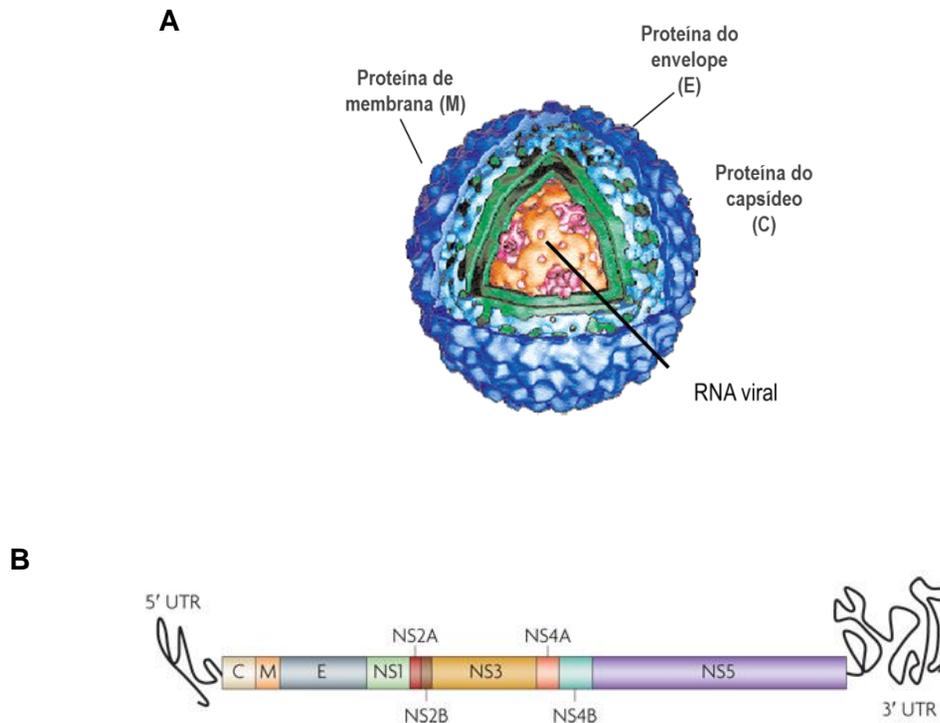
A primeira descrição da doença foi feita por Benjamin Rush, em 1780, durante um surto ocorrido na Filadélfia, Estados Unidos de América (EUA). A partir de então, numerosas epidemias de dengue foram descritas no século XIX, embora ainda se desconhecesse o seu agente (Gubler & Kuno 1997). O isolamento e a caracterização dos DENV (D1 e D2) só ocorreram durante a segunda Guerra Mundial, quando, então, foi possível atribuir as epidemias passadas a este agente infeccioso. O reconhecimento da etiogenia por quatro sorotipos e da patogenia da febre hemorrágica da dengue (FHD) / síndrome de choque da dengue (SCD) foi facilitado após a adaptação do DENV em animais de laboratório e pela disponibilidade de métodos de soro-neutralização, nas décadas 1940 (DENV-1 e DENV-2) e 1950 (DENV-3 e DENV-4) (Halstead 1980; Gubler & Kuno 1997; Halstead 2008).

## 1.2. Vírus dengue

Epidemiologicamente, os DENV são arbovírus e as doenças por eles causadas são conhecidas como arboviroses. Arbovírus são um grupo de vírus transmitidos entre hospedeiros vertebrados por vetores artrópodes, sendo, portanto capazes de replicar em ambos hospedeiros, vertebrado e invertebrado (Gubler & Kuno 1997).

A dengue é causada por quatro vírus antigenicamente distintos (DENV 1 - 4). Os DENV pertencem ao gênero *Flavivirus*, Família Flaviviridae (Halstead 1980; Wang et al. 2000; Guzman et al. 2010). Estes vírus são esféricos com envelope de lipopolissacarídes e medem cerca de 40-50 nm de diâmetro (Figura 2). O genoma de RNA é composto por uma molécula única de RNA de cadeia simples-positiva, com aproximadamente 11 kb de nucleotídeos, contendo uma única fase aberta de leitura (ORF – open Reading frame), que codifica três proteínas estruturais - capsídeo (C), precursora da proteína de membrana (PrM), e envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 2). Importantes propriedades biológicas do vírus dengue estão associadas com a glicoproteína E, incluindo receptores de ligação, hemaglutinação de eritrócitos e indução de anticorpos neutralizantes e a resposta imunológica de proteção (Guzman & Vazquez 2010).

Assim como ocorre com outros vírus de RNA, os DENVs exibem um alto grau de variabilidade genética devido à falta do mecanismo de correção da RNA polimerase viral durante a replicação, às rápidas taxas de replicação, ao grande tamanho populacional e à pressão exercida pela resposta imunológica do hospedeiro (Twiddy et al. 2003). Além disso, recentemente, tem-se sugerido importante participação do mosquito vetor na seleção de sub-populações/linhagens de DENV (Lambrechts et al. 2012).



**Figura 2. (A)** Vírus dengue (DENV). Adaptado de Perera e Kuhn, 2008. **(B)** Organização do genoma do vírus dengue. Regiões 5' e 3' não codificantes e a fase aberta de leitura indicando três proteínas estruturais (cápside (C), membrana (M) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de Guzman et al 2010.

Nos anos 1990, a utilização de métodos de sequenciamento do genoma viral e as análises filogenéticas permitiram a classificação dos DENVs em grupos geneticamente distintos, ou genótipos, dentro de cada sorotipo (Rico-Hesse 1990; Lewis et al. 1993; Lanciotti et al. 1994). Recentemente, análises filogenéticas baseadas no sequenciamento completo do gene E determinaram a existência de cinco genótipos para os DENV-1 (I, II, III, IV e V), seis para o DENV-2 (Asiático I, Asiático II, Cosmopolita, Americano, Sudeste Asiático/Americano e Selvagem), cinco para o DENV-3 (I, II, III, IV e V) e quatro genótipos para o DENV-4 (I, II, III e IV)(Weaver & Vasilakis 2009) (Tabela 1).

É importante ressaltar que a classificação dos DENVs em genótipos dentro de cada sorotipo está sendo constantemente revisada, uma vez que o sequenciamento e análises filogenéticas são aperfeiçoados e os bancos de dados de genomas expandem (Rico-Hesse 1990; Lewis et al. 1993; Lanciotti et al. 1994; Twiddy et al. 2003; Rico-Hesse 2003, Chen & Vasilakis 2011).

**Tabela 1.** Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Weaver & Vasilakis (2009)

Sorotipo	Genótipos	Distribuição geográfica
<b>DENV-1</b>	I	Sudeste Asiático, China, Leste da África
	II	Tailândia (1950 - 1960)
	III	Malásia (cepas selvagens)
	IV	Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália
	V	Américas, Oeste da África Africano, Ásia
<b>DENV-2</b>	Asiático I	Malásia e Tailândia
	Asiático II	Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilha do oceano Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	Americano	América Latina, Caribe (1950 - 1960), Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico
	Sudeste Asiático/Americano	Tailândia, Vietnã, Américas (últimos 20 anos)
	Selvagem	Oeste Africano e Sudeste Asiático (cepas isoladas em humanos, mosquitos silvestres ou macacos sentinelas)
<b>DENV-3</b>	I	Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África, Samoa, Tailândia (1962)
	IV	Porto Rico, Américas Latina e Central, Taiti (1965)
	V	Filipinas (1956), Japão (1973), China (1980), Brasil (2002 - 2004)
<b>DENV-4</b>	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão (provenientes do Sudeste Asiático)
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (cepas recentes)
	IV	Malásia (cepas selvagens)

### 1.3. Transmissão

Assim como em outras arboviroses, o DENV é mantido na natureza através de replicação cíclica em hospedeiros vertebrado e invertebrado, que no caso do DENV correspondem a primatas, principalmente o homem, e mosquitos. Humanos são infectados pela picada de mosquitos cuja saliva contem partículas virais infectantes. O período de incubação intrínseca em seres humanos é de 3 a 8 dias (Halstead 2008). Nos dias finais deste período e mesmo no início dos sintomas, os humanos infectados apresentam uma viremia elevada e capaz de infectar mosquitos susceptíveis. Quanto mais elevado o título viral no sangue circulante em um indivíduo virêmico, maiores as chances de haver infecção e disseminação do DENV para tecidos secundários do vetor *Ae. aegypti*. Da mesma forma, quanto maior o título viral em tecidos secundários do mosquito, tais como na cabeça e nas patas, maiores as chances do vírus ser encontrado na saliva do vetor e ser transmitido numa próxima picada em humanos (Nguyen et al. 2013).

O processo da infecção do *Ae. aegypti* começa quando o DENV ingerido juntamente com o sangue de um indivíduo virêmico alcança as células epiteliais da porção posterior do intestino médio do inseto. As partículas virais penetram nessas células são replicadas. Vários focos de replicação viral são notados nos primeiros dias após o repasto infectante. Paulatinamente, a infecção se torna generalizada neste epitélio e, por volta do 7<sup>o</sup>-10<sup>o</sup> dia o vírus atinge elevado título neste tecido (Salazar et al. 2007). Enquanto a replicação viral acha-se confinada ao estômago, o mosquito encontra-se infectado, porém não infectante, uma vez que as partículas virais ainda não se disseminaram deste tecido primário para tecidos secundários, dentre os quais as glândulas salivares, ovários e tecidos nervosos. Essa disseminação depende do vírus ultrapassar a barreira imposta pelo intestino médio, conhecida na literatura como *Midgut Infection Barrier* (MIB). Vencida esta barreira, o que acontece geralmente em torno de uma semana após o repasto infectante, o vírus atravessa a lâmina basal do epitélio e escapa através da hemocele e se espalha através da hemolinfa, num processo conhecido como *Midgut Escape Barrier* (MEB). O vírus vai se replicar novamente em vários tecidos e órgãos até que invade as

glândulas salivares. Para atingir os ácinos das glândulas salivares, as partículas virais necessitam vencer o que se chama *Salivary Gland Infection Barrier* (SIB). Nas glândulas salivares, o DENV replica de novo e, posteriormente, atravessa o epitélio e escapa para a luz da glândula num processo descrito como *Salivary Gland Escape Barrier* (SEB), o que se dá, geralmente, em 8 a 12 dias, ou mais. Posteriormente, durante a alimentação com sangue as partículas virais são injetadas num humano susceptível para completar o ciclo de transmissão (Gubler 1998b; Halstead 2008). O período decorrido entre a ingestão do sangue infectado pelo mosquito e o aparecimento das partículas virais infectantes na saliva é chamado de Período de Incubação Extrínseco (EIP) (Hardy et al. 1983; Beerntsen et al. 2000; Tabachnick 2013). A velocidade da replicação do DENV, a disseminação do vírus e a duração do EIP em mosquitos infectados oralmente são dependentes da temperatura ambiente, de características genéticas, tanto das populações dos mosquitos quanto das amostras circulantes do vírus, e do título viral no sangue ingerido pelo vetor (Hardy et al. 1983).

Esse processo de transmissão humano-vetor-humano é chamado transmissão horizontal. Também pode haver outro tipo de transmissão horizontal do vírus, que ocorre entre o macho e a fêmea durante a cópula. No caso do DENV e outros arbovírus, pode ocorrer também a transmissão vertical, que corresponde à transferência da infecção de uma fêmea de artrópode infetadas para a sua prole. O DENV pode ser transmitido verticalmente em mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Joshi et al. 2003; Castro et al. 2004).

A temperatura exerce grande influência no EIP. Por sua vez, a duração do EIP tem grande importância epidemiológica nas arboviroses: quando mais curto maior a chance de um mosquito infectado sobreviver ao EIP e poder transmitir o vírus, e vice-versa. Porém, somente uma parte da população de mosquitos de uma dada área apresenta taxa de sobrevivência compatível com o EIP (Maciel-de-Freitas et al. 2007). Assim, a transmissão de dengue geralmente requer uma elevada densidade populacional de mosquitos vetores ou tempos prolongados de sobrevivência do vetor (Hardy et al. 1983; Watts et al. 1987). Por isso, a variação do EIP exerce influência na

capacidade vetorial das populações naturais do vetor (Watts et al. 1987; Carrington et al. 2013).

#### **1.4. Ciclos de Transmissão de dengue**

O homem, os primatas não-humanos e os mosquitos do gênero *Aedes* são os hospedeiros naturais do DENV, sendo o homem o único a desenvolver a forma clínica da doença (Gubler 1998a).

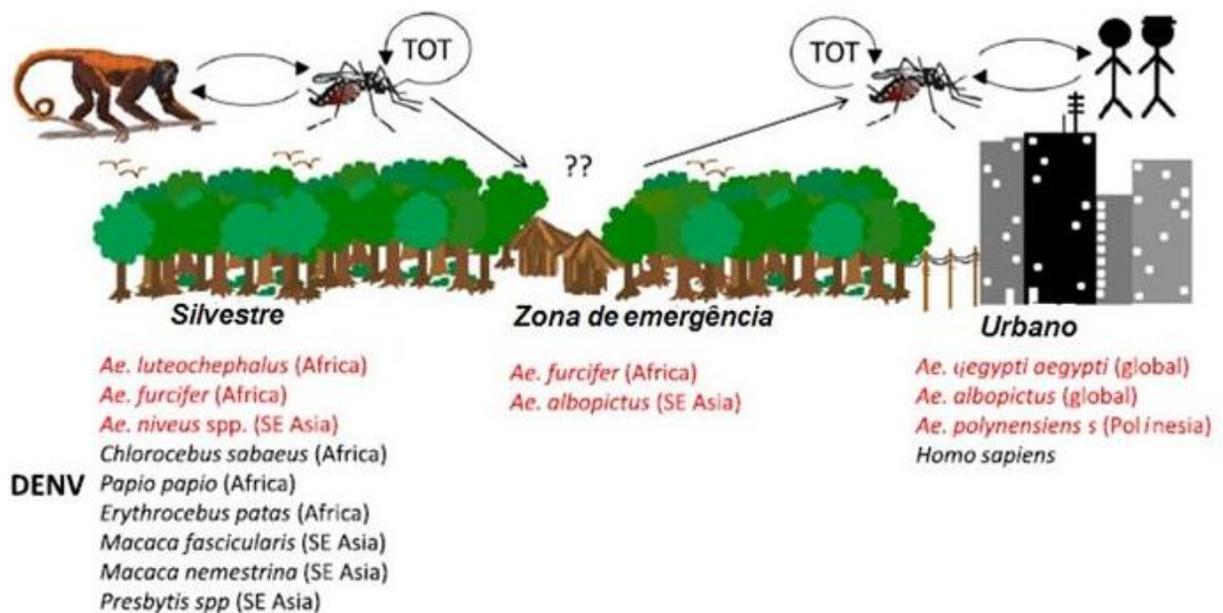
Os quatro sorotipos de DENV que hoje infectam humanos evoluíram como parasitas de primatas não-humanos. O sorotipo DENV-2 é enzoótico na África e os quatro sorotipos são enzoóticos na Ásia. O comércio entre a África ocidental e o resto do mundo resultou na introdução de *Ae aegypti* na Ásia e nos trópicos americanos, o que favoreceu a disseminação da forma epidemiológica urbana (Rev em Halstead 2008).

Assim, acredita-se que os quatro sorotipos de DENV são mantidos independentemente em dois ciclos de transmissão distintos: o silvestre e o urbano (Figura 3). O ciclo silvestre, que ocorre em regiões da África ocidental e no sudeste Asiático é mantido por primatas não-humanos e mosquitos de três subgêneros do gênero *Aedes* (*Stegomyia*, *Finlanya* e *Diceromyia*) (Gubler & Kuno 1997; Wang et al. 2000; Cardosa et al. 2009; Hanley et al. 2013). Por outro lado, no continente americano, a infecção é mantida somente através do contato entre homem infectado – mosquito - homem susceptível, em aglomerados urbanos e suburbanos (Halstead 2008; Hanley et al. 2013). Até a presente data, não existem evidências do ciclo de transmissão de DENV silvestre nas Américas (Gubler & Kuno 1997; Hanley et al. 2013), ainda que anticorpos contra DENV tenham sido detectados em animais silvestres que frequentam o ambiente modificado pelo homem na Guiana Francesa e RNA compatível com o de DENV-1 tenha sido encontrado em mosquito silvestre no Brasil (Thoisy et al. 2004; Thoisy et al. 2008; Lavergne et al. 2009).

Embora se acredite que os ciclos silvestre enzoótico/epizoótico e urbano sejam independentes, em 2008, foi evidenciada infecção de humanos com linhagem de

dengue silvestre. Isso aconteceu no sudeste da Ásia (Malásia), onde ocorreu uma infecção humana com DENV-2 de linhagem silvestre, sendo esta a primeira evidência de que uma cepa de DENV silvestre pode causar FHD (Halstead 2008; Cardoso et al. 2009; Hanley et al. 2013). No ano 2010, na África Ocidental, um homem residente na região de Canchungo, Guiné-Bissau, apresentou uma doença similar à dengue coincidentemente a uma epizootia de DENV silvestre dos anos 2008-2009 (Franco et al. 2011). Esses dados sugeriram que o vírus DENV de linhagem silvestre pode emergir num ciclo de transmissão urbana, suburbana ou rural, sem que haja pré-adaptação aos seres humanos (Hanley et al. 2013).

Atualmente, a maioria das infecções humanas são devidas a linhagens de DENV que circulam nos ambientes domésticos e peri-domésticos nos trópicos às custas da picada infectante de *Ae. aegypti*. No ciclo urbano, o homem e os vetores servem como os hospedeiros de amplificação e de reservatório do DENV (Gubler & Kuno 1997; Lambrechts et al. 2010; Hanley et al. 2013).



**Figura 3.** Principais mosquitos vetores (vermelho) e hospedeiro primatas não-humanos (preto) envolvidos no ciclo de transmissão silvestre e urbano de dengue. Adaptado de Hanley et al. (2013). TOT: Transmissão vertical.

## 1.5. Vetor

*Ae. aegypti* foi o primeiro mosquito incriminado como vetor de dengue (Bancroft 1906). Sua proposta foi confirmada e fundamentada pelos estudos clássicos de Cleland, Bradley e Mc Donald, em 1916 (Rev em Gubler & Kuno 1997; Halstead 2008). A incriminação de *Ae. aegypti* como vetor de DENV foi baseada em dois tipos de observações, epidemiológicas e experimentais, dentre elas, sua capacidade para transmitir DENV horizontalmente e verticalmente (Gubler & Kuno 1997). Além da dengue, *Ae. aegypti* também é vetor da febre amarela urbana (Gubler & Kuno 1997).

O habitat primitivo de *Ae. aegypti* é a África (Griffitts 1934; Hanley et al. 2013). Sem dúvida, o comércio entre África ocidental e o resto do mundo, levaram à introdução de *Ae. aegypti* nos trópicos americanos e na Ásia. Nos trópicos americanos, a infestação por *Ae. aegypti* começou com a expansão colonial europeia e o tráfico de escravos durante o século XVI, que resultou na importação simultânea de DENV, febre amarela (FA) e o *Ae. aegypti*. Importantes epidemias de FA foram relatadas ao longo dos séculos nas Américas (Griffitts 1934; Halstead 1980; Gubler & Kuno 1997; Wilson & Chen 2002; Halstead 2008).

O ciclo de vida de *Ae. aegypti* é composto das seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. Os machos são fitófagos, ao passo que as fêmeas são hematófagas, embora possam se alimentar de açúcares obtidos de vegetais. Após cerca de três dias de um repasto sanguíneo, uma fêmea fecundada deposita os seus ovos num criadouro, correspondente a recipiente contendo água parada. Os ovos são postos fora da água, aderindo individualmente à parede interna e úmida do recipiente, próximo à superfície da água. Após a embriogênese, os ovos podem ficar latentes por meses fora da água, pois resistem à dessecação. A eclosão dos ovos se dá após a sua imersão em água. As larvas e pupas são aquáticas. As primeiras se alimentam de matéria orgânica depositada ou em suspensão na água do criadouro. O período larval leva cerca de uma semana em condições favoráveis, ou seja, quando não há elevada densidade larval nos criadouros, reduzida fonte de nutrientes, baixo volume líquido e baixa temperatura. As pupas não se alimentam e geram adultos em

cerca de 2-3 dias. Os adultos emergidos dos criadouros procuram abrigos em locais úmidos, escuros e protegidos de vento, geralmente dentro das residências. Os machos emergem antes das fêmeas, as quais são fecundadas precocemente. As fêmeas procuram se alimentar de sangue com maior intensidade aos 3<sup>o</sup> - 5<sup>o</sup> dias da emergência. Após a hematofagia, pode se iniciar o processo de vitelogênese, que resultará na gravidez da fêmea e postura dos ovos em cerca de 3 dias. Contudo, *Ae. aegypti* apresenta frequentemente discordância gonotrófica, quando mais de um repasto sanguíneo é necessário para que a fêmea se torne grávida (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Os criadouros de *Ae. aegypti* são depósitos artificiais produzidos pelo homem e que contém água parada de aspecto limpo e transparente. São muitos os exemplos de criadouros, que vão desde pequenos depósitos abandonados (variados tipos de recipientes de plástico e metal, pneumáticos) ou não (calhas entupidas, ralos, vasos de flores) até grandes recipientes (caixas d'água, cisternas, piscinas sem uso). Geralmente, os criadouros de grande porte apresentam características propícias ao desenvolvimento das fases larvares e têm grande importância epidemiológica, pois podem gerar grande número de pupas por dia (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Maciel-de-Freitas et al. 2008).

*Ae. aegypti* é uma espécie essencialmente antropofílica, urbana e endófila. Sua eficiência para transmitir o DENV é decorrente não só de fatores intrínsecos, relativo à sua susceptibilidade ao vírus, como também do seu comportamento e distribuição espacial. Esta última, por sua vez, é influenciada pela ecologia humana: urbanização rápida e descontrolada, deterioração do ambiente urbano, diminuição de padrões sanitários, que resultam numa maior amplificação das populações de *Ae. aegypti* e aumentam seu contato com o homem (Gubler & Kuno 1997; Halstead 2008).

A transmissão de DENV é fortemente influenciada pelas distribuições espacial e temporal do vetor *Ae. aegypti* e por sua densidade populacional. Com efeito, diferentes padrões de distribuição espacial e de densidade populacional do vetor correspondem a diferentes padrões de transmissão do DENV (Morrison et al. 1998;

Getis et al. 2003). Tem-se observado que o mosquito *Ae. aegypti* pode se dispersar por distâncias tão grandes como 600-1.000 m, especialmente quando não há barreiras geográficas ou durante períodos de menor oferta de criadouros, ou seja, meses de menor pluviosidade (Honorio et al. 2003; Maciel-de-Freitas & Lourenço-de-Oliveira 2009). De fato, dispersão em *Ae. aegypti* é estimulada pela procura de sítios para a oviposição e de fontes sanguíneas. Assim, quanto menor a oferta de criadouros, maior a dispersão dos mosquitos. Contudo, de modo geral as fêmeas de *Ae. aegypti* dispersam pouco, tendo-se registrado concentrações heterogêneas de fêmeas no espaço, essencialmente próximas aos criadouros perenes (Maciel-de-Freitas et al. 2010). Uma vez que a dispersão da fêmea do vetor é geralmente restrita, maior é a frequência de alimentação sanguínea em indivíduos de uma mesma casa ou grupo de casas infestadas, o que justificaria o fato de que poucas fêmeas infectadas poderiam transmitir o vírus a várias pessoas suscetíveis neste pequeno espaço (Getis et al. 2003).

A temperatura e a precipitação pluviométrica têm impacto na sobrevivência do vetor. Uma vez que a temperatura também influencia o EIP, o incremento da temperatura média e da pluviosidade leva ao aumento de risco de transmissão de DENV (Honório et al. 2009; Johansson et al. 2009). Assim, mesmo nos países e localidades endêmicas, e dependendo do estado imune da população, epidemias de dengue são frequentes nos meses de maior pluviosidade e de mais elevadas temperaturas.

Uma vez que ainda não existe uma vacina eficiente e tetravalente (que induza à proteção contra os quatro sorotipos de DENV), a profilaxia e o controle do dengue são essencialmente feitos a partir do combate ao vetor *Ae. aegypti*. O controle do vetor visa reduzir a densidade populacional do mosquito a níveis baixos e insuficientes para que se dê a transmissão, o que é feito essencialmente em duas frentes: a eliminação dos criadouros, inclusive dos potenciais, e o seu tratamento com inseticidas. O primeiro dos métodos é o mais indicado, pois o uso de inseticidas continuamente tende a levar à resistência nas populações naturais dos mosquitos (Da-Cunha et al. 2005; Montella et al. 2007; Fonseca-González et al. 2010). Contudo,

durante epidemias, a redução drástica e rápida da população de mosquitos em uma dada localidade necessita ser feita através do uso de inseticidas.

Historicamente, a malária, a dengue, a febre amarela, as filarioses, as leishmanioses e outras doenças transmitidas por artrópode-vetores representaram um grande entrave ao progresso nos séculos XVII a XX em muitas partes do mundo em vista da morbidade e da mortalidade por elas causadas (Rev em Gubler 1998b). A descoberta de inseticidas químicos e de ação residual facilitou o controle e erradicação dessas doenças de grande parte da Europa e das Américas. Por exemplo, o efetivo uso de inseticidas de ação residual nas décadas 1940s, 1950s e 1960s contribuíram para a erradicação do *Ae. aegypti* de vários países, resultando na erradicação da febre amarela urbana em quase todo o mundo (Gubler & Kuno 1997; Gubler 1998b; Brathwaite et al. 2012). No entanto, os programas de controle das doenças transmitidas por vetores tiveram curta duração, e algumas doenças ressurgiram nos anos 1970, um ressurgimento que se intensificou consideravelmente nos últimos 20 anos (Hammon 1973; Bruce-Chwatt 1979; Krogstad 1996).

Por quase 20 anos (1970 – 1990), a maneira considerada mais eficaz para se evitarem as epidemias de FHD a partir do controle de adultos de *Ae. aegypti* em áreas urbanas era a aplicação de inseticidas a ultra-baixo volume (ULV), principalmente de malathion (Lofgren 1970; Gubler 1989). Infelizmente, precisou que se passassem 20 anos para se perceber que essa abordagem tem pouco ou nenhum impacto sobre a população de *Ae. aegypti* (Gubler 1989). Similarmente, o tratamento de criadouros com larvicidas químicos e agentes de controle biológico não tem sido eficaz (Torres & Castro 2007).

No caso do Peru, a partir de 1984, o Ministerio de Salud (MINSa), estabeleceu o combate do *Ae. aegypti* baseado no controle químico dos criadouros, com a utilização de um larvicida de ação residual, assim como de inseticidas piretróides contra as formas aladas (ULV), estes últimos utilizados durante as epidemias de dengue (MINSa 2011).

O monitoramento da resistência de *Ae. aegypti* aos inseticidas no Peru é feito seguindo-se a metodologia padronizada pela Organização Mundial de Saúde

(OMS)(WHO 1958) e bioensaios com garrafas, patrocinados pelo CDC (Brogdon & McAllister 1998; Zamora et al. 2009). Em 2005, o Instituto Nacional de Salud do Peru (INS), detectou resistência de *Ae. aegypti* à permetrina e resistência para confirmar a deltametrina, na localidade Andrés Araujo (Tumbes)(Balta & Villaseca 2005). Em 2011, amostras de *Ae. aegypti* de Iquitos (Loreto) revelaram-se susceptíveis à alfacipermetrina, ao passo que as provenientes de Puerto Maldonado (Madre de Dios) eram resistentes à alfacipermetrina, mas susceptíveis à deltametrina (MINSA 2011). Em Sullana (Piura), foi demonstrada resistência à deltametrina e suscetibilidade à alfacipermetrina e à lambdacialotrina (INS).

Sabe-se que o uso contínuo dos inseticidas leva a uma pressão nas populações naturais e seleciona populações resistentes. Foi o que aconteceu no Peru, onde o uso contínuo de inseticidas gerou o desenvolvimento da resistência aos inseticidas em algumas populações de *Ae. aegypti* (Balta & Villaseca 2005; Bisset et al. 2007; Rodriguez et al. 2007).

## **1.6. Dengue nas Américas**

A dengue nas Américas tem um padrão endêmico-epidêmico. Geralmente, as epidemias ocorrem a cada três ou cinco anos. A história epidemiológica da dengue foi agrupada em quatro períodos de tempo, baseando-se principalmente na circulação do DENV e seu principal vetor (*Ae. aegypti*) (Brathwaite et al. 2012).

1) Introdução de DENV nas Américas (1600-1946). Associa-se a introdução do dengue nas Américas com a infestação do continente pelo *Ae. aegypti*. No século XIX, as epidemias de dengue foram relacionadas com o comércio intercontinental e ocorreram principalmente no Caribe, mas também nas Américas do Norte, Central e do Sul. As epidemias continentais mais expressivas quanto ao número de casos foram registradas nos anos de 1818 e 1873, no Peru, com 50.000 casos (Gubler & Kuno 1997; Wilson & Chen 2002; Brathwaite et al. 2012), e em New Orleans, com 40.000 casos. No fim de século XIX e começo do século XX, foi registrada a maior dispersão de DENV no continente americano, atingindo países tanto localizados nos

limites norte quanto ao sul das Américas, como os Estados Unidos de América (EUA), Chile e Argentina (Halstead 1980; Brathwaite et al. 2012).

2) Eliminação de *Ae. aegypti* (1947-1970). O sucesso da campanha de erradicação continental de *Ae. aegypti*, coordenado pela Organização Panamericana da Saúde (OPAS), foi alcançado entre os anos 1946 e 1970, em 23 países das Américas Central e do Sul. Nas áreas onde *Ae. aegypti* foi eliminado, a transmissão de dengue foi interrompida (PAHO 1997; Wilson & Chen 2002; Gubler 2011; Brathwaite et al. 2012). Conseqüentemente, neste período não foram relatadas epidemias por DENV nas Américas (Wilson & Chen 2002).

A não continuidade do programa de erradicação do vetor ao longo do tempo deveu-se principalmente à perda de força política para campanhas de controle, à estrutura centralizada do programa, ao saneamento ambiental insuficiente e simultâneo ao rápido crescimento dos centros urbanos e à dispersão passiva do mosquito. Outro fator que contribuiu para a descontinuidade do programa de erradicação e subsequente reinfestação por *Ae. aegypti* em países americanos foi o desenvolvimento da resistência do mosquito ao DDT e a outros inseticidas organoclorados (PAHO 1997; Wilson & Chen 2002; Torres & Castro 2007; San Martín et al. 2010; Brathwaite et al. 2012).

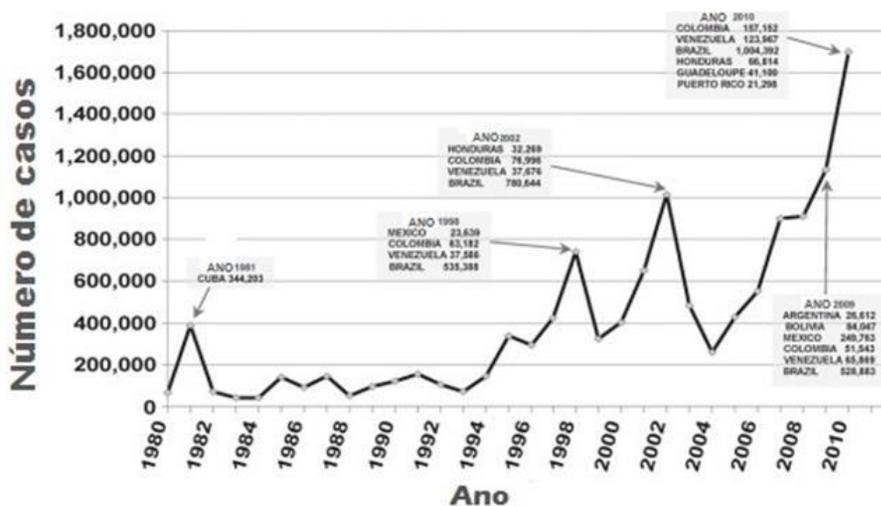
3) Maior dispersão de *Ae. aegypti* (1971-2000). A deterioração do programa de controle durante os anos 1960 levou à reintrodução e expansão geográfica do mosquito em muitos países americanos, e ao aparecimento das epidemias causadas por diferentes sorotipos e genótipos de DENV, em vários países das Américas. Nos anos 1980, o número de casos de FHD/SCD foi incrementado consideravelmente, e essa tendência foi mantida durante as décadas seguintes (Figura 4). Em 1981, Cuba informou uma epidemia por DENV-2, com 344.203 casos, destes 10.312 foram de FHD e 158 óbitos (101 dos óbitos foram em crianças). A partir desta epidemia foram descritos os principais dados clínicos, virológicos e epidemiológicos de FHD/SCD. Esta epidemia foi considerada uma das piores nesse período (Kouri et al. 1989). A segunda maior epidemia de FHD ocorreu em 1989-1990, na Venezuela, quando foram registrados 3.108 casos de FHD (Rev em Wilson & Chen 2002).

A cronologia do aparecimento de sorotipos de DENV nas Américas ocorreu na seguinte sequência: DENV-2 (1953), DENV-3 (1963), DENV-1 (1977), DENV-4 (1981); em 1994, foi reintroduzido o DENV-3.

Nesse período (1971-2000), o DENV-2 foi predominante e esteve associado com casos fatais. No ano de 1998, um aumento significativo dos casos foi relatado nas Américas, apresentando-se mais de 700.000 casos de dengue e mais de 12.000 casos de FHD. Daqueles 700.000 casos, o Brasil foi responsável de mais de 500.000 casos (Wilson & Chen 2002; Siqueira et al. 2005). Estas epidemias foram registradas em vários países incluindo Argentina, após 82 anos de ausência de transmissão autóctone (Brathwaite et al. 2012).

4) Circulação do DENV (2001-2010). Nessa década, foram relatados os maiores números de casos de dengue, com a circulação dos quatro sorotipos quase generalizada geograficamente no continente. Durante esse período, ocorreram duas epidemias Pan-Americanas nos anos 2002 e 2010. Na epidemia de 2002, registraram-se mais de 1,0 milhão de casos, incluindo 14.374 FHD e 255 óbitos. O Brasil foi responsável por mais de 75% do número total de casos (Siqueira et al. 2005). Na epidemia de 2010, ocorreram mais de 1,7 milhões de casos, com 50.235 casos graves e 1.185 óbitos, apresentando uma incidência > 200 casos/100.000 habitantes em vários países (Brathwaite et al. 2012).

Na verdade, houve um aumento de 4,6 vezes de casos de dengue relatados nas Américas durante as últimas três décadas. Esta constatação mostra uma mudança no perfil epidemiológico da dengue nas Américas, particularmente após o fracasso da iniciativa da erradicação de *Ae. aegypti*. Além disso, mostra a transição de um estado endêmico-epidêmico para altamente endêmico nas Américas (San Martín et al. 2010; Brathwaite et al. 2012)

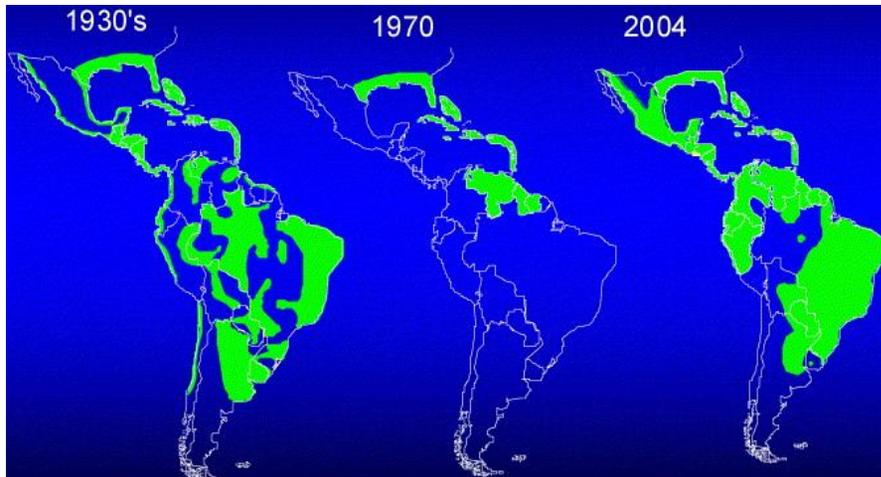


**Figura 4.** Número de casos de dengue nas Américas, 1980 – 2010. Fonte: (Adaptado de Brathwaite et al. 2012).

### 1.7. Dengue no Peru

Há relatos de epidemias de dengue e febre amarela urbana no século XIX no Peru, o que indiretamente indicaria a presença do *Ae. aegypti* no país (Arce 1919; Gubler & Kuno 1997). Acredita-se que Lima era infestada por *Ae. aegypti* em 1852 (Sevilla et al. 2001). Pode-se inferir acerca da possível dispersão territorial de *Ae. aegypti* no território peruano a partir da análise geográfica das epidemias passadas, que se estenderam ao longo de toda região da costa, incluindo Lima e os departamentos desde Tumbes até Tacna, e na região da Amazônia (nordeste, departamento de Loreto) (Arce 1919; Griffiths 1934; Mendez 1987; Gubler & Kuno 1997; Sevilla et al. 2001).

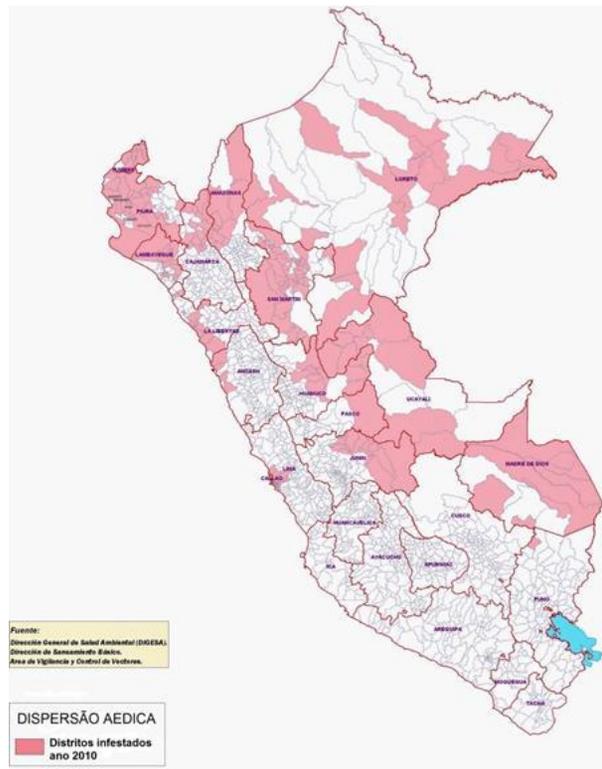
Assim como vários países americanos, o Peru conseguiu erradicar o *Ae. aegypti* de seu território durante a campanha supracitada organizada pela OPAS. O Peru foi declarado livre de *Ae. aegypti* em 1958, como resultado da vigilância e controle do vetor em 191 localidades previamente infestadas, cumprindo os critérios de erradicação em áreas urbanas e rurais preconizados pela OPAS (Severo 1958; Soper 1963; Sevilla et al. 2001). No entanto, a presença de alguns focos nas Américas e a falta da continuidade das políticas da erradicação no continente favoreceram a reinfestação de *Ae. aegypti* em vários países das Américas (Severo 1958; Maguiña et al. 2005; MINSA 2010) (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuição de *Ae. aegypti* nas Américas, nas décadas de 1930, em 1970 depois da campanha da erradicação e ano de 2004, após três décadas da campanha. Fonte: DJ Gubler, 2004. Copyright © 2004 Elsevier Ltd.

Em consequência, o *Ae. aegypti* foi reintroduzido no Peru em 1984, na Amazônia. Sua descoberta foi feita em cidades dos departamentos Loreto e Ucayali, por técnicos do Ministério de Saúde (Phillips et al. 1992). Entre os anos 1984 e 1998, o *Ae. aegypti* se espalhou rapidamente daí para outras cidades das regiões da Amazônia, selva alta e costa norte (Instituto Nacional de Salud 2002; Leiva & Cáceres 2004).

Até 2011, 18 regiões e 269 distritos das regiões da Amazônia, costa (norte e centro) e selva alta relataram a presença de *Ae. aegypti* na área urbana, o que implica numa população em risco de transmissão de dengue de aproximadamente 12 milhões de pessoas. Nestes últimos anos, foi notável a dispersão do *Ae. aegypti* nos departamentos de Puno e Cusco. Essa dispersão foi facilitada pelas atividades nas estradas da Rodovia Inter-Oceânica, mudanças na estrutura agrária, colonização da floresta, aumento da atividade de exploração mineira e pela dinâmica populacional interna, que mantém permanentes fluxos humanos e de mercadorias entre as regiões, dentre outras causas (MINSa 2011) (Figura 6).



**Figura 6.** Distribuição geográfica do *Ae. aegypti* por distritos no Peru, ano 2010. Fonte: DIGESA 2010.

*Ae. aegypti* é o único transmissor natural do dengue no Peru e nos demais países americanos. A ocupação de áreas sem planejamento urbano ou saneamento básico em várias áreas do Peru resulta na falta de água potável, levando ao armazenamento de água inadequadamente e em recipientes acessíveis ao vetor. Conseqüentemente, o número de criadouros disponíveis tem aumentado em grande escala. Por outro lado, nas regiões de clima quente e úmido, que também sofrem com a falta de fornecimento de água potável, muitos criadouros são gerados durante a estação das chuvas, tais como pneus, latas, garrafas, plásticas não biodegradáveis e outros recipientes abandonados a céu aberto (Gubler & Kuno 1997; Getis et al. 2003; MINSa 2011).

Os primeiros casos de Dengue Clássico (DC) como doença re-emergente ocorreram no ano 1990, na região da Amazônia Peruana, nas cidades de Iquitos (departamento Loreto) e Tarapoto (departamento San Martín), e foram causados pelo vírus dengue sorotipo 1. Em Iquitos, a epidemia afetou cerca de 76 mil pessoas, o que corresponde a aproximadamente 25% da população local (Phillips et al. 1992;

Watts et al. 1998). Em Tarapoto, registrou-se uma incidência de 775,87 casos por 100.000 habitantes (Bueno et al. 1998; Watts et al. 1998; Maguiña et al. 2005). Após a epidemia, os estudos sorológicos realizados entre os anos de 1991 e 1992 na cidade de Iquitos, revelaram uma prevalência de anticorpos anti-DENV equivalente a 66% no setor urbano, 32% a 67% nas populações residentes nas localidades de florestas chuvosas e 26% na área rural (revisado em Watts et al. 1998). Posteriores, amostras de soros colhidas de crianças com idade escolar nos anos de 1993 e 1994, de nove localidades de diferentes áreas da cidade, mostraram uma prevalência de anticorpos de 14%, porém com um intervalo entre 2%- 47% dentre as escolas, o que mostrou que o risco da infecção foi espacialmente heterogêneo dentro da cidade. Por outro lado, esses resultados mostraram que a cidade de Iquitos tornou-se endêmica (Watts et al. 1998).

Assim, nos anos seguintes, o vírus DENV-1 se dispersou pelo Peru. Tal dispersão foi facilitada pelo fato de que as comunidades urbanas do interior, como Iquitos, estão interligadas por um importante sistema de transporte aéreo. Iquitos tem conexões aéreas diárias com as outras cidades da Amazônia e com a costa norte (Watts et al. 1998; Cabezas 2005a; Maguiña et al. 2005). Estudos sorológicos realizados entre os anos de 1994 e 1995 nas cidades de Iquitos, Tarapoto e Pucallpa na Amazônia, e Piura, na costa norte, verificaram uma endemicidade crescente: a prevalência de anticorpos foi de 67%, 59%, 64% e 41%, respectivamente (Watts et al. 1998).

No ano de 1995, cinco anos depois da epidemia por DENV-1, houve a introdução do DENV-2 (genótipo americano) na cidade de Iquitos. Houve um aumento do número de casos, mas sem manifestações hemorrágicas (FHD/SCD). A infecção secundária com o vírus DENV-2 não levou ao aparecimento de FHD. Esse achado foi uma surpresa frente à prevalência de anticorpos na população. Ou seja, verificou-se que 86.1% da população tinha tido infecção por DENV-2, e que 60.5% estavam tendo infecção secundária por DENV-2 (Watts et al. 1998; Kochel TJ 2002; Wilson & Chen 2002; Halstead 2008; Guzman & Vazquez 2010). Até 1999, foram relatadas diversas epidemias de dengue nas regiões da Amazônia, costa norte e

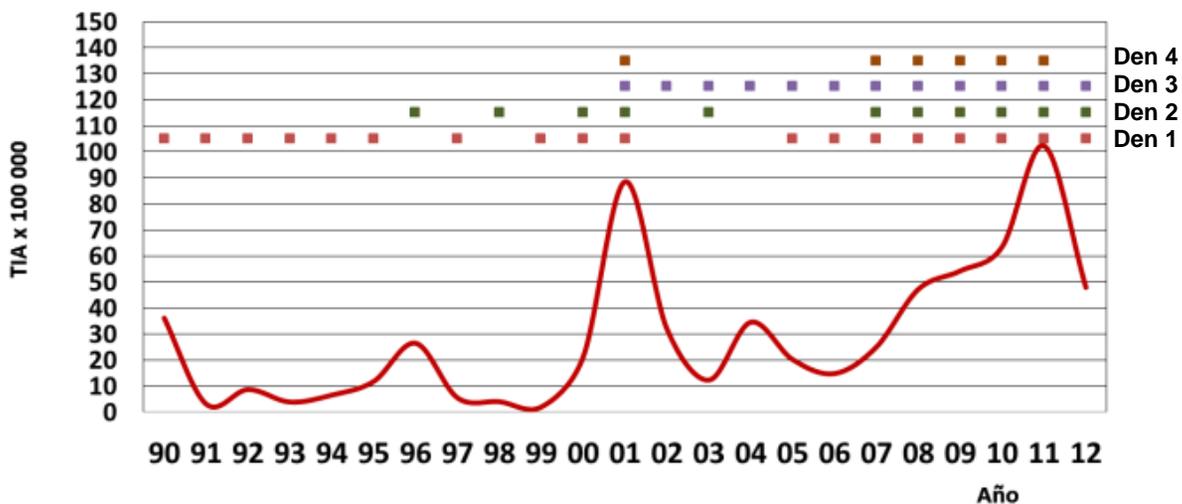
selva alta, com a circulação apenas do vírus DENV-1 ou com a co-circulação dos DENV-1 e DENV-2 (genótipo americano).

Em 2000, os quatro sorotipos de dengue já estavam circulando nas Américas (Wilson & Chen 2002; Brathwaite et al. 2012). O Peru não foi exceção e, entre 2000 e 2003, epidemias importantes ocorreram na região da costa norte, confirmando-se a circulação dos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Mostorino et al. 2002; Montoya et al. 2003). Além disso, observou-se a circulação dos genótipos: Americano e Asiático de DENV-2 e registraram-se os primeiros casos de FHD causados pelo sorotipo II Americano e Asiático/Americano (Mostorino et al. 2002; Montoya et al. 2003). Nestes anos, um total de 12 departamentos foi atingido com epidemias de dengue, reportando-se 23.329 casos de DC e FHD, dos quais 251 foram FHD e quatro óbitos (PAHO 2001). Até o ano de 2004, houve relatos de epidemias de dengue com a circulação dos quatro sorotipos em 15 departamentos localizados na região da Amazônia, costa norte e selva alta, com registros de casos de FHD em Tumbes, Piura e La Libertad (Mostorino et al. 2002; Montoya et al. 2003; Maguiña et al. 2005).

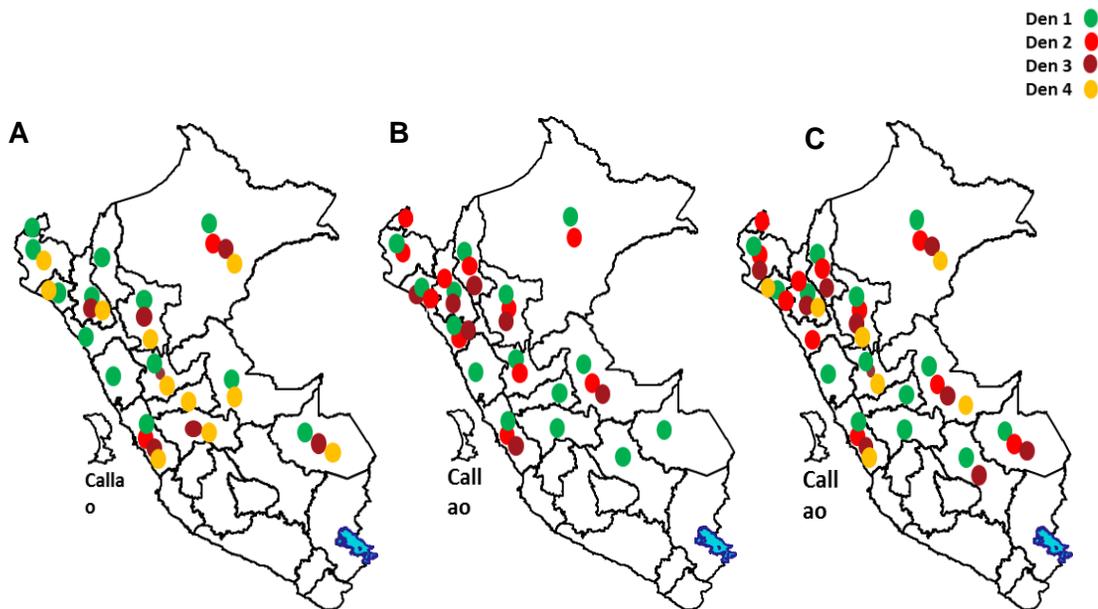
O *Ae. aegypti* foi reencontrado na capital do país, Lima, somente em 2000. Nesta época, os casos de dengue diagnosticados em Lima eram importados. A primeira epidemia de dengue autóctone registrada em Lima ocorreu 2005, depois de quase 60 anos de ausência de transmissão local (Lastres 1951; Maguiña et al. 2005). Essa epidemia foi resultado da constante migração de pessoas provenientes de áreas endêmicas de dengue das regiões da Amazônia e costa norte (Sevilla et al. 2001). Assim, entre março e abril de 2005, foram relatados casos de dengue autóctones pelo sorotipo DENV-3, genótipo Asiático, no distrito de Comas, departamento de Lima (Gutiérrez et al. 2005; Mamani et al. 2005). Porém, o impacto da epidemia de dengue em Lima não mostrou característica explosiva e os casos foram classificados como DC (Cabezas 2005b). Em 2008, o DENV-4, genótipo II emergiu no nordeste do Peru, causando uma epidemia explosiva e deslocando o DENV-3, que tinha predominado nos anos anteriores (2000 e 2008) (Forshey et al. 2009).

Nos últimos cinco anos, o Peru relatou crescente número de epidemias sazonais de dengue por múltiplos sorotipos, com um sorotipo predominante. Os quatro sorotipos estão circulando no país, onde 18 departamentos das regiões da Amazônia, costa e selva alta têm relatado casos autóctones (Arrasco 2011). Tem-se observado igualmente um aumento significativo do número dos casos anuais, com taxas de incidência que vão desde 31,5 até 101,0. Também observou-se tanto um aumento dos casos de Dengue Grave (DG) (59 – 205 casos), quanto do número de óbitos (1 até 41) (PAHO 2009; 2010; 2011; 2012). Neste período, merece destaque uma epidemia de enormes proporções de carácter explosiva, devida ao genótipo América/Ásia do DENV-2 (Twiddy et al. 2002; Oliveira et al. 2010; Mamani et al. 2011), ocorrida em Iquitos (departamento de Loreto): foram 22.714 casos e 19 óbitos (Arrasco 2011; Dirección General de Epidemiología 2011).

No Peru, a cronologia do aparecimento de sorotipos de DENV ocorreu na seguinte sequência: DENV-1 (1990), DENV-2, genótipo Americano (1995), DENV-3 e DENV-4 (2000-2001), DENV-4, genótipo II (2008) e DENV-2, genótipo América/Ásia (2011) (Figuras 7 e 8). (Phillips et al. 1992; Watts et al. 1998; Kochel TJ 2002; Wilson & Chen 2002; Halstead 2008; Mostorino et al. 2002; Montoya et al. 2003; Forshey et al. 2009; Mamani et al. 2011; Arrasco 2011).



**Figura 7.** Taxa de incidência de dengue por 100.000 habitantes e sorotipos envolvidos (DENV 1 – 4), no Peru, 1990-2012. Fonte: DGE-MINSA, 2012.



**Figura 8.** Mapa de distribuição de sorotipos de dengue (DENV 1-4) por departamentos do Peru. **A:** 2010; **B:** 2011; **C:** 2012. Instituto Nacional de Salud-MINSA, 2012.

### 1.8. Competência vetorial

A competência vetorial é um dos parâmetros que integram a determinação da capacidade vetorial de uma população natural de um inseto transmissor. A capacidade vetorial é definida quantitativamente e é influenciada por variáveis tais como a densidade do vetor, longevidade e bem como a competência do vetor (Rev em Beerntsen et al. 2000). Tabachnick (2013) definiu capacidade vetorial como o conjunto de fatores que permitem que um artrópode encontre um patógeno para se infectar e transmiti-lo, uma vez que encontre um hospedeiro susceptível.

A competência vetorial é definida como a permissividade intrínseca de um vetor a um parasito, permitindo o seu desenvolvimento e/ou replicação e a sua transmissão. No caso do DENV, uma população de mosquitos é competente para transmitir o vírus quando o vírus é capaz de infectar, replicar, disseminar no organismo até a glândula salivar e ser transmitido através da saliva dos indivíduos que ingerem sangue virêmico. Fatores específicos, especialmente aspectos genéticos dos vírus, a genética de populações de mosquitos e o meio ambiente, interferem na

eficiência da transmissão do DENV (Hardy et al. 1983; Kramer et al. 1983; Failloux et al. 2002). Gubler & Rosen (1976) foram os primeiros a estudar a competência vetorial de *Ae. aegypti* frente ao DENV, e foram os primeiros a descrever uma “barreira intestinal” (MIB) para a disseminação do vírus após a sua replicação no epitélio do estômago (ou intestino médio) do mosquito. Essa barreira determinaria a capacidade do vírus se disseminar a outros tecidos ou não, independentemente da replicação viral no intestino médio, inclusive a altos títulos.

A susceptibilidade à infecção, ou seja, a permissividade do que se acredita ser a principal barreira, a MIB, seguida da disseminação do vírus para o restante do organismo do hospedeiro invertebrado, é determinada geneticamente (Bennett et al. 2002; Black et al. 2002). Hoje, sabe-se que uma estreita combinação entre genótipos dos mosquitos e genótipos virais é decisiva na determinação desse fenótipo, denominado competência vetorial (Bosio et al. 2000; Lambrechts et al. 2012). Variações genéticas intraespecíficas no mosquito vetor influenciam os vários sistemas de barreiras supracitados, impedindo ou permitindo a infecção de diversas células e tecidos e a disseminação do vírus a partir de um tecido para outro. Essas barreiras são controladas geneticamente e podem ser expressas em várias proporções em uma população de mosquitos, afetando a epidemiologia da dengue (Hardy et al. 1983).

Vários autores, como Craig (1967), Hardy et al. (1983) e (Tabachnick 2013) destacam que um conjunto de fatores genéticos regula a capacidade vetorial do mosquito para transmissão dos arbovírus. Assim, vários estudos tem mostrado a existência de polimorfismo na expressão da susceptibilidade e da resistência à infecção oral de acordo com a origem geográfica de mosquitos vetores de *Alphavirus*, *Bunyavirus* e *Flavivirus*.

Estudos realizados em muitos países tem mostrado existir variabilidade genética e na dinâmica populacional de *Ae. aegypti* no espaço e no tempo, decorrentes dos fatores do ambiente, como as chuvas, os fatores relacionados com a atividade humana, a densidade populacional humana, a distribuição espacial e tipo de criadouros do mosquito e a aplicação de inseticidas. Estes fatores influenciam na

estrutura genética do mosquito que, por sua vez, determina a competência vectorial das populações de *Ae. aegypti* (Failloux et al. 2002).

Em estudo realizado por Paupy et al. (2003), em Phnom Penh (Camboja), detectou-se grande variação na estruturação genética das populações de *Ae. aegypti* de acordo com o tipo de ambiente e tipo de criadouros mais frequentes do mosquito e a época do ano (chuvas e seca). Esses autores verificaram baixos níveis de fluxo gênico em populações do *Ae. aegypti* do sul do Camboja no final da estação seca, o oposto tendo sido verificado no norte. A competência do vetor avaliada através da infecção oral com DENV-2 segundo protocolo de Vazeille-Falcoz et al. (1999), revelou diferença significativa na competência vectorial durante a estação seca. Com isso, os autores concluíram que a dinâmica da difusão do vírus dengue depende da estrutura genética dos vetores e da sua dinâmica no tempo e no espaço.

Huber et al. (2002) investigaram populações do mosquito *Ae. aegypti* do Vietnam segundo a variabilidade genética, por meio de isoenzimas e por polimorfismo de microssatélites, e a susceptibilidade ao DENV-2. Esses autores encontraram variação na diferenciação genética e nas taxas de disseminação do DENV-2 entre populações de *Ae. aegypti* avaliadas na estação seca.

Lourenco-de-Oliveira et al. (2004) encontraram alta heterogeneidade nas taxas de infecção experimental com DENV-2 e com o vírus da febre amarela nos mosquitos *Ae. aegypti* de mais de 20 localidades do Brasil. Essa heterogeneidade era presente mesmo quando os autores consideravam diferentes amostras do vetor de um mesmo estado, como o Rio de Janeiro, porém procedentes de distintos tipos de biótopo. Entretanto, estes resultados contrastam com os obtidos em países vizinhos, com ecossistemas menos variável, como a Guiana Francesa (Fouque et al. 2001), onde as taxas de infecção experimental pelo vírus dengue foram homogêneas em todo o país. Variações entre o título viral e o genótipo viral usado também podem explicar diferenças entre experimentos ou baixa taxa de infecção (Diallo et al. 2008).

Esses exemplos enfatizam que a sensibilidade ao DENV, ou seja, a capacidade vectorial de populações naturais *Ae. aegypti* para transmitir dengue varia

geograficamente segundo sua história evolutiva e características do ambiente as quais as populações desse mosquito estão submetidas (Bennett et al. 2002; Huber et al. 2002). Alguns estudos também sugerem a existência de diferenças na capacidade de replicação do DENV nas células do vetor de acordo com o genótipo, linhagem ou origem geográfica do vírus. Ou seja, cepas de vírus ou genótipos virais de origem diversa podem revelar diferenças na eficiência da infecção e disseminação viral em *Ae. aegypti* (Rosen et al. 1985; Gubler & Kuno 1997; Armstrong & Rico-Hesse 2003; Pepin et al. 2008). Portanto, a competência vetorial seria resultado de uma estreita interação no binômio genótipo do vetor – genótipo viral. Assim, já se verificou que cepas isoladas em diferentes localidades ou que circularam em diferentes momentos em dada localidade comportam-se diferentemente em vetores de outra localidade ou quando testados em períodos diferentes. Notou-se, por exemplo, que linhagens de DENV-1 foram recentemente substituídas por outras linhagens de um mesmo genótipo, por exemplo, no Brasil e na Tailândia. A capacidade das linhagens que circularam no passado e daquela que circulam hoje em serem transmitidas por amostras de mosquitos contemporâneos pode ser diferente, sugerindo uma estreita influência do mosquito na seleção de linhagens, como observado por Lambrechts et al. (2012) na Tailândia. A co-circulação de diferentes vírus ou de diferentes sorotipos virais em uma mesma população de mosquitos pode igualmente exercer pressão seletiva de linhagens mais eficientemente transmitidas pelos vetores.

No Peru, as populações de *Ae. aegypti* podem ser divididas em dois grandes grupos ou variantes genéticas, segundo análises pelo método *Single Stranded Conformational Polymorphism* (SSCP): o primeiro grupo incluiria as populações de Iquitos (Loreto), Jaén (Cajamarca), Lambayeque (Lambayeque) e Tingo Maria (Huanuco), e o segundo incluiria as de Huaquillas (do Equador), Zarumilla (Tumbes), Sullana (Piura) e o Rímac (Lima) (Leiva & Cáceres 2004). Esta distribuição corresponde claramente a duas populações, uma costeira e outra existente no Nordeste. Os resultados de Leiva & Cáceres (2004) porém mostraram não haver relação entre as distâncias genéticas das populações de *Ae. aegypti* estudadas e as distâncias geográficas entre as localidades analisadas. É provável que as importantes barreiras geográficas existentes no Peru exerçam um papel importante na dispersão ativa e, conseqüentemente, no fluxo genético entre populações do mosquito. Com

efeito, a Cordilheira dos Andes seria uma grande barreira separando as duas variantes identificadas neste estudo (Leiva & Cáceres 2004).

Uma vez que a competência vetorial é determinada geneticamente, é provável, portanto, que existam diferenças na competência vetorial ao DENV entre populações costeiras e orientais de *Ae. aegypti* do Peru. Além disso, no Peru, há variações fitogeográficas e climáticas importantes entre a região costeira, a serra e a Amazônia. Na zona da Amazônia, mais úmida, há um regime de chuvas completamente diverso das demais zonas. Na costa, há épocas em que a temperatura varia drasticamente, além do que há grandes áreas desérticas. Há também muitas diferenças de infraestrutura (fornecimento de água, organização urbana) e densidade humana, que além do regime das chuvas, definem a existência de uma diversidade de tipos de criadouros de mosquitos segundo as zonas. Tal variabilidade ambiental deve exercer grande influência na estrutura genética das populações peruanas de *Ae. aegypti* e, conseqüentemente, na competência vetorial das diferentes populações naturais.

## 2. Objetivo geral

- Avaliar a densidade e a competência vetorial de populações de *Aedes aegypti* do Peru ao vírus dengue tipo 2

### 2.1. Objetivos específicos:

- Estimar a densidade de *Ae. aegypti* nas diferentes regiões climáticas e fitogeográficas do Peru com distintos históricos epidemiológicos de dengue.
- Avaliar competência vetorial de populações de *Aedes aegypti* procedentes de zonas peruanas com diferentes características geoclimáticas e com histórias epidemiológicas diferentes para dengue, através de infecções experimentais com DENV-2 isolado do Peru.
- Determinar as taxas de disseminação do vírus DENV-2 nos mosquitos infectados experimentalmente e o título viral na cabeça dos espécimes em que houve disseminação do vírus.
- Comparar a competência vetorial de uma mesma população de mosquito peruana frente a amostras de DENV2 que circulam no Peru e no Brasil, para investigar a existência de vantagem adaptativa entre os genótipos do vetor e do vírus simpátrico.
- Investigar a existência de diferentes perfis de resistência a inseticidas de populações peruanas de *Ae. aegypti* no Peru e confrontá-los com aqueles da competência vetorial.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Descrição das características epidemiológicas das áreas de estudo**

O Peru está localizado na zona ocidental e intertropical da América do Sul, e ocupa uma área de 1.285.220 km<sup>2</sup>, com uma população de cerca de 28 milhões de habitantes. O país é politicamente dividido em 25 regiões administrativas compostas por 195 províncias, as quais estão divididas em distritos Chowell et al. (2011).

O país tem três regiões naturais denominadas costa, serra e amazônia. A dengue atinge as três regiões. No entanto, na serra, por ser um território com diversidade de altitudes que abrangem áreas de serras andinas e de selva, a dengue só atinge as áreas de menor altitude, denominada selva alta, localizada no flanco oriental dos Andes peruanos (Pulgar-Vidal 1981).

Para o presente estudo foram selecionadas doze localidades destas três regiões. Na costa, foram selecionadas quatro localidades dos departamentos de Tumbes e Piura, na selva alta, escolhemos quatro localidades dos departamentos de Amazonas e Junin, e, na amazônia, quatro localidades dos departamentos de Loreto e Madre de Dios, de acordo com o mostrado na Figura 9.



Localidades de estudo:

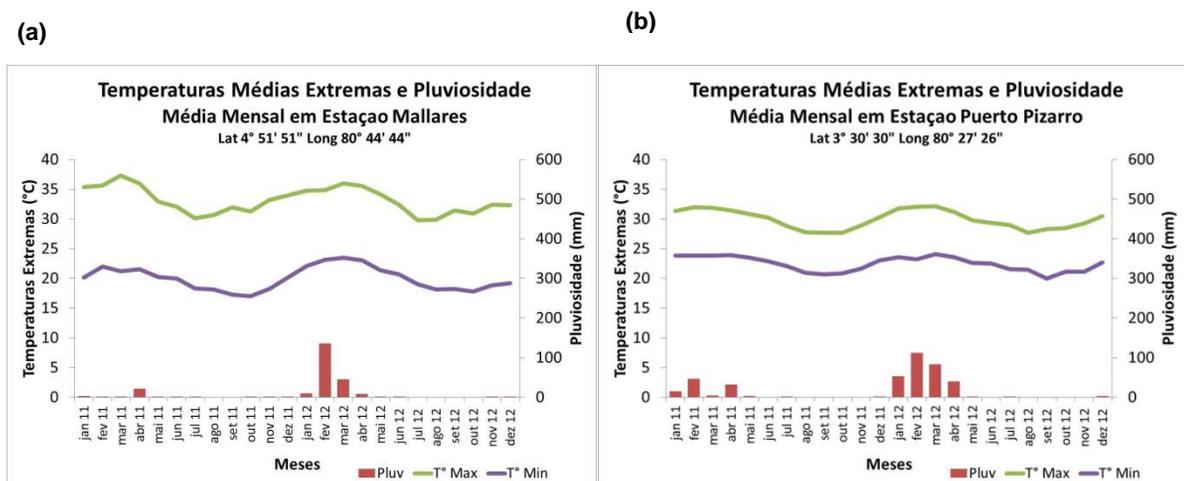
1. Sanchez Cerro (SCE)
2. Villa Primavera (VPR)
3. La Curva (LCU)
4. Buenos Aires (BAI)
5. Bagua Grande (BGR)
6. Bagua Chica (BCH)
7. Rio Negro (RNE)
8. Santa Leonor (SLE)
9. Punchana (PUN)
10. San Juan (SJU)
11. Puerto Maldonado (Setor 9) (PM9)
12. Puerto Maldonado (Setor 7) (PM7)

**Figura 9.** Mapa das regiões fito-geográficas do Peru. (A) costa, (B) selva alta e (C) Amazônia. Fonte: INRENA-PERU.

A costa é formada por uma estreita faixa do território peruano (marcada em creme na Figura 9). Este território estende-se da borda oceânica até 500 metros acima do nível do mar (msnm), no lado ocidental dos Andes. O relevo costeiro é caracterizado pelos desertos que vão de Tacna até Tumbes. Nesta região se encontram também pequenos vales formados por rios que descem dos Andes. Ao longo da costa, há a presença da corrente fria de Humboldt, que segue essencialmente paralela à cordilheira dos Andes. Essas duas características - a corrente fria e a presença dos Andes - produzem um ambiente árido e seco na costa devido à falta da chuva. A costa tem três zonas: central, sul e norte. As zonas costeiras central e do sul possuem duas estações: o inverno (de abril a outubro) e o verão (entre novembro e março). O costeiro norte, não sofre igualmente os efeitos da água fria, resultando em quase 300 dias de sol e temperaturas quentes durante todo

o ano (até 35°C no verão), com chuvas ocorrendo entre novembro e março (Pulgar-Vidal 1981).

Na costa, nos departamentos de Piura e Tumbes, a temperatura média máxima alcança 30°C no verão, ao passo que a média mínima é em torno de 21°C no inverno. As chuvas só acontecem no verão (essencialmente de janeiro a março, podendo incluir o mês de abril), e não supera 1.000 mm por ano. O clima é subtropical, quente e úmido (Figura 10).



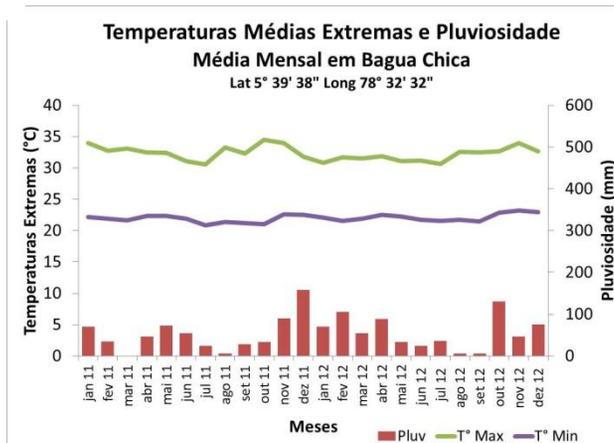
**Figura 10.** Temperaturas extremas e pluviosidade de região da costa: **(a)** Estação Mallares (Piura) e **(b)** Estação Puerto Pizarro (Tumbes), Peru. Fonte: SENAMHI, estações de coordenadas da localização geográfica mais próxima das áreas do estudo.

A região denominada serra pode ser dividida fito-geograficamente em serra propriamente dita (atitudes acima de 2300 msnm) e selva alta (400 a 1400 msnm). Escolhemos localidades na zona de selva alta para representar a região da serra na presente investigação, uma vez que *Ae. aegypti* é ausente na serra propriamente dita devido à elevada altitude. A região selva alta está localizada no flanco oriental dos Andes. A topografia é bastante acidentada. A parte superior tem declives acentuados e vales estreitos que são mais extensos nas partes mais baixas com relevo moderado. Das montanhas, descem numerosos riachos e também rios caudalosos que têm um curso rápido e impetuoso com cachoeiras e desfiladeiros. Esta zona é caracterizada por estar coberta por uma densa vegetação. A região denominada

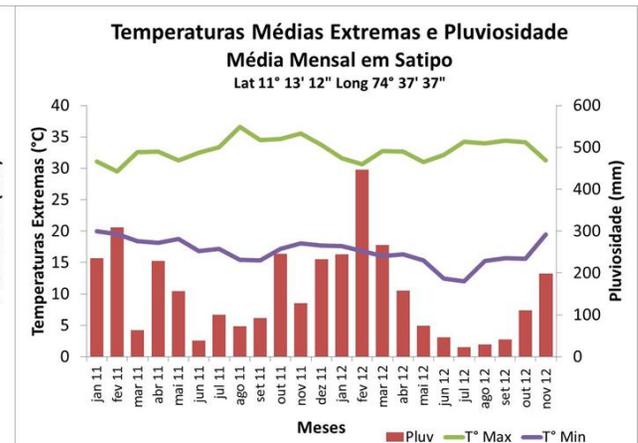
selva alta tem clima que vai do tipo subtropical ou temperado, com uma média mensal de 26°C e com chuvas abundantes (cerca de 3.000 mm por ano) entre novembro e março e dias com muito sol e pouca chuva de abril a outubro (Pulgar-Vidal 1981).

Na selva alta, o departamento Amazonas tem pouca cobertura de nuvens ao longo do ano. Como resultado, há escassa pluviosidade e se registram médias máximas de temperatura superior a 30°C, podendo até mesmo exceder 36°C em alguns dias dos meses de outubro e novembro. O clima varia entre semiseco, quente e úmido. No departamento de Junin, durante o verão, a média máxima de temperatura supera os 30°C, com exceção nos dias com chuvas contínuas. No inverno, registra-se uma temperatura média mínima em torno de 18°C. Os meses de maiores chuvas são os compreendidos de setembro a março, quando a pluviosidade chega a superar os 2.000 mm por ano. É de clima chuvoso, quente e muito úmido (Figura 11).

(a)



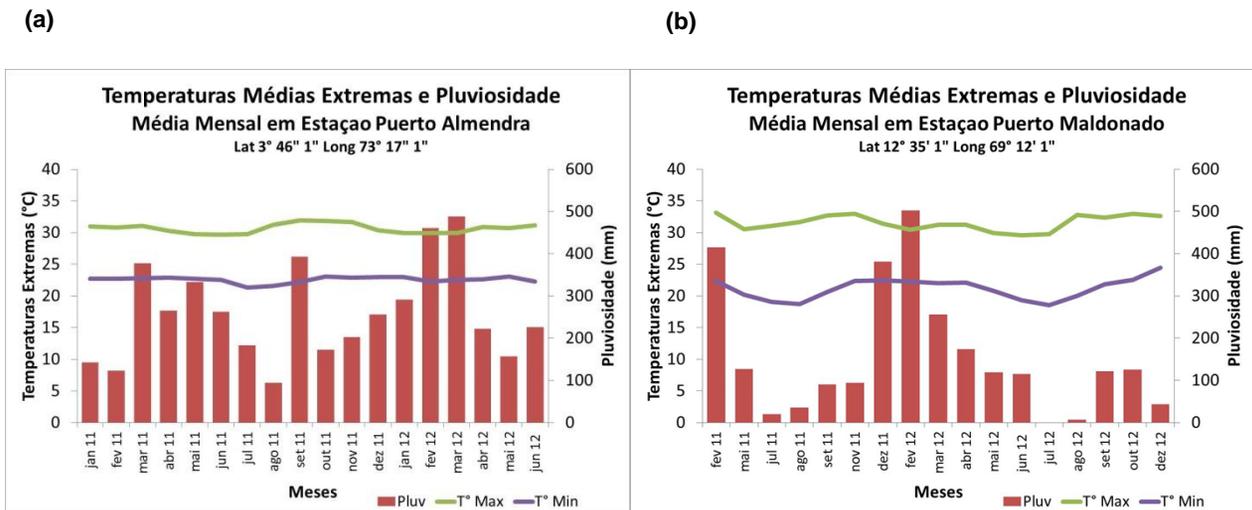
(b)



**Figura 11.** Temperaturas medias extremas e pluviosidade de região da selva alta (a) Estação Bagua Chica (Amazonas) e (b) Estação Satipo (Junin), Peru. Fonte: SENAMHI, estações de coordenadas de localização geográfica mais próxima das áreas de estudo.

A região da amazônia também é conhecida pelo nome de planície amazônica. Seu território está localizado abaixo de 500 msnm, porém variando essencialmente entre 80 e 400 msnm. O relevo desta zona é caracteristicamente plano, com o terreno coberto por densa vegetação conhecida como "Mata". Há frequentemente inundações durante as cheias dos rios. O clima é quente, úmido e chuvoso. A temperatura média nesta zona é de 25°C ou menos. As chuvas são abundantes, levando a uma pluviosidade média anual de 1.000 a 5.000 mm, sendo os meses de fevereiro e março os mais chuvosos (Pulgar-Vidal 1981).

Os departamentos de Loreto e Madre de Dios registram médias máximas e mínimas entre 29°-33°C e de 20°C-22°C, no verão e inverno, respectivamente. Os meses de maior pluviosidade são fevereiro e março, com valores em torno de 400 mm médios mensais. A pluviosidade anual é superior aos 2.000 mm e inferior a 3.500 mm. O clima é chuvoso, quente, superúmido (Figura 12).



**Figura 12.** Temperaturas médias extremas e pluviosidade de região da Amazônia: **(a)** Estação Puerto Almendras (Loreto) e **(b)** Estação Puerto Maldonado (Madre de Dios), Peru. Fonte: SENAMHI, estações de coordenadas de localização geográfica mais próxima das áreas de estudo.

A Tabela 2 mostra as principais características geográficas das localidades escolhidas para a amostragem de mosquitos e realização do presente estudo.

**Tabela 2.** Características geográficas e dados de população das localidades.

Região	Dpto.	Província	Densidade Populacional (Hab/Km <sup>2</sup> )*	Localidade	Coordenadas geográficas	Altura msnm
<b>Costa</b>	Piura	Sullana	53,0	Sanchez Cerro	Lon. 80° 69' Lat. 4° 90'	59
				Villa Primavera	Lon. 80° 71' Lat. 4° 90'	66
	Tumbes	Zarumilla	55,9	La Curva	Lon. 80° 15' Lat. 3° 29'	13
		Tumbes	79,1	Buenos Aires	Lon. 80° 26' Lat. 3° 34'	25
<b>Selva Alta</b>	Amazonas	Utcubamba	12,5	Bagua Grande Sector Visalot Medio	Lon. 78° 26' Lat. 05° 45'	467
		Bagua	28,2	Bagua Chica Sectores I e II	Lon. 78° 32' Lat. 05° 38'	446
	Junin	Satipo	10,1	Rio Negro	Lon. 74° 39' Lat. 11° 12'	661
				Santa Leonor	Lon. 74° 38' Lat. 11° 14'	640
<b>Amazônia</b>	Loreto	Maynas	4,1	Punchana Sector 4	Lon. 73° 25' Lat. 3° 72'	97
				San Juan Sector 34	Lon. 73° 30' Lat. 3° 79'	102
	Madre de Dios	Tambopata	2,2	Puerto Maldonado Sectores 1 e 9	Lon. 69° 12' Lat. 12° 34'	256
				Puerto Maldonado Sectores 7 e 10	Lon. 69° 10' Lat. 12° 36'	256

Dpto: Departamento. Fonte: \*INEI. Censo Nacional 2007. <http://inei.inei.gob.pe/inei/SIRTOD/>. Última data de acesso 28/04/2013.

A densidade populacional humana é maior nos departamentos localizados na região da costa (53,0 a 79,1 Hab/Km<sup>2</sup>) em relação aos departamentos localizados na

selva alta (10,1 a 28,2 Hab/Km<sup>2</sup>) e naqueles da amazônia, onde a população é mais rarefeita (2,2 a 4,1 Hab/Km<sup>2</sup>). As localidades escolhidas na região da costa situam-se em torno de 13 a 66 msnm, as da selva alta entre 446 a 661 msnm e as da amazônia estão em entre 97 a 256 msnm.

A proliferação do mosquito vetor da dengue em várias localidades (ex: Punchana, Sanchez, Cerro e Satipo) se favorece da falta de infraestrutura e de saneamento básico, como o descontínuo ou precário abastecimento de água (Tabela 3), condição que obriga a população a utilizar recipientes para armazenar água, tanto nas regiões da costa quanto na selva alta e amazônia. Com efeito, a falta de água potável está associada com 41,2% dos casos de dengue relatados no Peru (MINSA 2010). Também, nas localidades com pluviosidade elevada, como naquelas da região da amazônia, a quantidade de criadouros disponíveis para o desenvolvimento das formas imaturas do vetor, tais como pneus, garrafas, bebedouros para animais, dentre outros, aumenta consideravelmente na estação chuvosa.

No Peru, a infestação larvária é medida pelo índice predial, que relaciona o número de casas positivas por cada 100 casas inspecionadas. Nos anos de 2011 e 2012, os maiores índices de infestação prediais se registraram na selva alta e na amazônia, e os menores na costa. A Tabela 3 mostra, resumidamente, as principais características de cada localidade no que diz respeito a aspectos relativos à proliferação e controle do *Ae. aegypti*.

**Tabela 3.** Tipo de reservatórios mais comumente encontrados com formas imaturas, índice de infestação larvária por *Ae. aegypti* e percentual de casa como fornecimento de água por localidade em 2011 – 2012.

Região	Dpto.	Casa sem água %*	Província	Porcentagem		Ano		
				Tipo de recipiente **	%**	2011 I.A %**	2012 I.A %**	
Costa	Piura	41,8	Sullana	200 L e < 50 L	75,7	0,2 - 1,4	0,4 - 2,9	
				Vasos				
	Tumbes	31,6	Zarumilla	200 L e < 50 L	75,6	0,0 - 2,7	0,0 - 8,9	
				Vasos	3,6			
			Pneus	10,2				
			Tumbes	Inservíveis	0,6	0,0 - 6,3	0,0 - 8,5	
Selva Alta	Amazonas	59,2	Utcubamba	200 L e < 50 L		0,0 - 7,8	0,0 - 8,7	
				Vasos				
				Bagua	Pneus		0,0 - 10,0	0,0 - 6,0
					Inservíveis			
Junin	40,6	Satipo	200 L e < 50 L	36,9	0,0 - 4,0	0,0 - 20,0		
			Vasos	6,4				
			Pneus	46,8				
				Outros	9,9			
Amazônia	Loreto	34,3	Maynas	> 200 L	8,0	2,4 - 12,2	1,2 - 8,6	
				< 50 L	52,0			
					Vasos	6,0		
					Pneus	1,0		
				Outros	15,0			
				Inservíveis	18,0			
	Madre de Dios	38,4	Tambopata	200 L e < 50 L	47,0	0,0 - 7,4	1,67 - 15,3	
				Vasos	2,0			
					Pneus	9,0		
					Inservíveis	40,0		

Dpto: Departamento; \*I.A: Índice de infestação predial.

Fonte: \*INEI. Censo Nacional 2007. \*\*Unidade de Vigilância e controle de vectores. DIGESA.MINSA. Ano 2011 (Outubro e Novembro); Ano 2012 (Janeiro e Março).

A DIGESA estabeleceu critérios de avaliação risco de dengue segundo Índice predial, da seguinte forma: < 1,0%, baixo risco, entre 1 < 2%, risco mediano e > 2,0% alto risco.

Ainda que circulem os quatro sorotipos de dengue no Peru, os sorotipos circulantes predominantes recentemente nas localidades escolhidas para o estudo variou entre os últimos anos (Tabela 4). Em 2011, nas regiões de costa, selva alta e Amazônia, os casos de dengue foram causados pelos quatro sorotipos em proporções essencialmente semelhantes, embora em Tumbes não se tenham registrado casos pelos sorotipos DENV-3 e DENV-4 e, em Madre de Dios, este último sorotipo não tenha sido detectado. No entanto, no ano de 2012, a maioria dos casos na costa foi causado pelo DENV-1, ao passo que na selva alta e na Amazônia houve predomínio dos DENV-1 e DENV-2 (Tabela 4). Em 2011 e 2012, a maioria dos casos e dos óbitos por dengue no país foi registrada no departamento de Loreto, região da Amazônia.

**Tabela 4.** Sorotipos, casos e óbitos por dengue reportados nos anos 2011 – 2012 nas regiões e departamentos onde foram feitos os estudos, no Peru.

Região	Dpto.	Ano 2011			Ano 2012		
		Sorotipos *	Casos **	Óbitos **	Sorotipos *	Casos **	Óbitos **
<b>Costa</b>	Piura	1, 2, 3, 4	280	0	1	1355	1
	Tumbes	1, 2	258	0	1	840	1
<b>Selva Alta</b>	Amazonas	1, 2, 3, 4	494	1	2	713	2
	Junin	1, 2, 3, 4	116	0	1	842	3
<b>Amazônia</b>	Loreto	1, 2, 3, 4	22714	19	1, 2	4588	10
	Madre de Dios	1, 3, 2	1978	6	1, 2	2351	1

Dpto: Departamento. Sorotipo 2: Genótipo América/Ásia.

Fonte: \*INS. Casos autóctones confirmados pelo laboratório (qRT-PCR no tempo real e isolamento celular), \*\* MINSa-DGE-RENACE.

## **3.2. Populações de *Ae. aegypti* e amostras de vírus DENV-2**

### **3.2.1. Amostragem de mosquitos *Ae. aegypti* nas diferentes localidades**

As amostragens de *Ae. aegypti* foram feitas essencialmente a partir da coleta de ovos, tendo sido exceção a amostragem feita no departamento Amazonas, localidades de Bagua Grande e Bagua Chica, onde não logramos conseguir instalar armadilhas para ovo, sendo a coleta de larvas em criadouros a alternativa mais viável. As coletas foram feitas em dois momentos: primavera e outono (Tabela 5).

Para a coleta de ovos, foram instaladas 40 armadilhas de oviposição contendo infusão de feno como atraente (Reiter et al. 1991; Lourenco de Oliveira et al. 2003) em cada localidade. Todas as armadilhas continham 270 mL de água desclorada e 30 mL de infusão de feno a 10%, previamente incubada durante sete dias. Em cada localidade, foram utilizados, comparativamente, dois tipos de suporte para coleta dos ovos: tira de madeira, ou paleta, de 12 cm x 2,5 cm, ou tira de papel-toalha disposta em torno da borda interior das armadilhas. As armadilhas foram instaladas em residências, ao nível do solo, em área sombreada, sendo observadas a cada três dias. Depois de 7 dias de instaladas, as armadilha eram recolhidas e os suportes de oviposição substituídos (Villaseca et al. 2001; Honorio et al. 2003). Esta operação foi repetida uma vez na semana seguinte para se ampliar a amostragem. A cada coleta eram contados o número de ovos por armadilha.

Cada casa foi referenciada com GPS (Garmin) para a obtenção de coordenadas de localização geográfica de latitude e longitude. Durante a instalação de armadilhas para a coleta dos mosquitos, foram anotadas algumas condições climáticas visando-se monitorar eventual influência de parâmetros, como temperatura e pluviosidade, no sucesso de coleta dos mosquitos e no tamanho da amostra nas diferentes localidades.

No departamento Amazonas, as larvas e pupas foram coletadas manualmente com pipetas, em recipientes achados em várias casas.

As paletas de madeira ou as tiras de papel contendo os ovos foram colocadas a secar por cerca de uma semana. Em insetário próprio, as papeletas ou tiras de papel foram imersas em água de acordo com a localidade e estação de coleta para permitir a eclosão das larvas e obtenção da geração F0. O número de larvas eclodidas por armadilha e estação de coleta foi devidamente anotado de modo a se determinar a taxa de eclosão.

As larvas obtidas foram alimentadas com ração comercial para peixe. Com a finalidade de se obterem mosquitos para a realização dos experimentos de determinação da competência vetorial, as fêmeas emergidas foram mantidas com os machos da mesma área e alimentadas em camundongos lactantes a cada dois dias para incentivar a oviposição. Para tal, foram introduzidas paletas de madeira em recipiente com água dentro da gaiola de manutenção da geração F0, nas quais as desovas foram recolhidas. Para se obterem as gerações F1 e F2, essas últimas paletas foram mantidas segundo Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), em local com umidade ( $80\pm 10\%$  UR) e temperatura ( $27\pm 1^\circ\text{C}$ ) controladas, até o momento oportuno à realização das infecções orais.

Na grande maioria dos casos, a infecção experimental com vírus DENV-2 foi realizada com mosquitos da geração F1. Não foi possível obter suficiente quantidade de larvas F1 de algumas populações de *Ae. aegypti* coletadas no Peru (coletas feitas entre novembro e dezembro/2011). Os ovos de muitas desovas desidrataram devido, provavelmente, a problemas de manutenção dos mesmos no local de coleta. Com o objetivo de superar este problema, obtivemos ovos de progênie F2. Para garantir a obtenção de ovos viáveis, o processo de maturação dos ovos foi aprimorado, que consistiu na sua estocagem durante 10 dias em câmara úmida após a desova.

As gerações F0 das populações de campo foram estabelecidas no insetário do Laboratório de Entomologia, do Centro Nacional de Salud Publica, Instituto Nacional de Salud, Lima-Peru. Já as gerações F1 e F2 foram mantidas no insetário do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LATHEMA), IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. As condições de umidade e temperatura em ambos insetários foram mantidas controladas entre  $80\pm 10\%$  UR e  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente.

Como controle das infecções experimentais e da susceptibilidade e/ou resistência aos inseticidas, foram utilizados, respectivamente, mosquitos *Ae. aegypti* das cepas Paea, de comprovada elevada susceptibilidade ao vírus dengue é originária da Polinésia Francesa (Vazeille-Falcoz et al. 1999), e Rockefeller, de susceptibilidade comprovada ao inseticidas (Da-Cunha et al. 2005). A cepa Paea, foi proporcionada pelo Instituto Pasteur, Paris-França, e vem sendo mantida no insetário do Laboratório de Transmissores, IOC/Fiocruz, desde 2003; a cepa Rockefeller foi proporcionada pelo CDC-Atlanta, e vem sendo mantida no Laboratório de Entomologia, CNSP/INS-Lima, desde abril de 2008.

#### **3.2.1.1. Obtenção das fêmeas F1 ou F2 para os experimentos de infecção.**

Para os experimentos de determinação da competência vetorial, foram utilizados mosquitos *Ae. aegypti* das gerações F1 ou F2 provenientes de colônias abertas, estabelecidas a partir de exemplares coletados em seis localidades peruanas durante a estação da primavera de 2011. Cada uma destas localidades representa diferentes departamentos das três regiões climáticas e fitogeográficas peruana, sendo: Sanchez Cerro (Piura) e La Curva (Tumbes), da região costeira, Rio Negro (Junin) e Bagua Grande (Amazonas), da região da selva alta, e Punchana (Loreto) e Porto Maldonado 7 (Madre de Dios), na região amazônica.

Em todas as localidades, a geração F0 foi estabelecida a partir de ovos, exceto as do departamento Amazonas, respectivas à estação de primavera, quando a F0 só foi obtida a partir de larvas e pupas coletadas em criadouros achados nas casas.

Os ovos das gerações F0 ou F1 eram induzidos à eclosão pela submersão em água desclorada. No dia seguinte, cada 100 larvas de 1º estágio, nascidas de cada desova, eram transferidas para uma cuba plástica com tampa coberta por filó e alimentadas com levedo de cerveja. Depois de três dias, trocava-se a água e se alimentavam as larvas com levedo de cerveja a cada 48h. As pupas eram retiradas com pipetas a cada dois dias e transferidas para potes com água desclorada, os quais eram deixados dentro de gaiolas de papelão cilíndricas (17 x 17 cm) onde eclodiam os adultos. Essas gaiolas eram cobertas por filo e continham um frasco

contendo solução açucarada (sacarose a 10%), acessível aos mosquitos através de um chumaço de algodão. A criação nos mosquitos foi feita de acordo com Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

As fêmeas assim obtidas eram mantidas juntamente com machos até o momento da triagem, que ocorria na véspera da infecção, decorridos 5-7 dias da emergência do primeiro adulto. Os mosquitos foram alimentados com solução açucarada até a véspera da infecção, quando eram triados segundo o sexo. A triagem dos mosquitos foi realizada sobre banho de gelo. Assim, depois de anestesiados pelo frio, os machos eram desprezados e as fêmeas eram separadas em lotes e contadas. Para cada experimento, oito a 10 lotes de 60 fêmeas/lote foram dispostos em gaiolas de plástico cilíndricas teladas na parte superior (12 x 6,5 cm), com fundo móvel.

### **3.2.2. Amostras de vírus utilizadas**

Inicialmente, foram selecionadas quatro amostras de DENV-2 do Peru e do Brasil. As amostras pré-selecionadas foram: amostra HAI 212, obtida de soro de paciente (Iquitos, Peru), pelo laboratório de Arbovírus CNSP/INS, Peru; amostra 63444, isolada de soro de paciente (Brasil), amostra 16681, isolada de soro de paciente (Brasil) e amostra 935/1274, isolada de mosquito *Ae. aegypti* (Brasil). Todas as amostras isoladas de humanos do Brasil pertenciam à coleção de amostras depositadas e caracterizadas pelo Laboratório de Flavivirus, IOC.

Todos os estoques das amostras virais foram produzidos em cultura de células de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36 (Igarashi 1978), e tituladas após sucessivas passagens. Para tal, houve inoculação das amostras virais em garrafas (*Cell Culture Flask-Tissue Culture treated- Costar USA, 25cm<sup>2</sup>*) contendo uma monocamada de células C6/36 e 10 ml de meio L-15 Leibovitz (Sigma – USA), e 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco-Brl, USA). Após a formação da monocamada, o sobrenadante foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB (manutenção). Após 10 dias de incubação com a amostra, a monocamada de células foi solta através de agitação do meio. As suspensões de células infectadas foram diluídas em série de  $10^{-1}$  a  $10^{-11}$ .

### **3.2.2.1. Titulação e produção de vírus para inoculações**

A titulação dos vírus DENV-2 do Peru e do Brasil foi realizada em tubos de hemólise, inoculando-se as diluições seriadas supracitadas diretamente sobre a monocamada de células C6/36, depois da retirada do meio de manutenção. Inoculou-se 0,1 ml da suspensão por tubo de hemólise, sendo quatro tubos por diluição, a partir da diluição  $10^{-1}$ . Incubou-se por 1 hora, em câmara de incubação tipo BOD a 28°C. Durante este tempo, o meio era homogeneizado sobre a camada de célula a cada 15 minutos. A seguir, era adicionado 0,9 ml de meio L-15 com 2% de SFB e incubado em estufa a 28°C.

Os tubos foram observados, diariamente, em microscópio invertido para a detecção de efeito citopático (ECP). No décimo dia após a inoculação, os tubos foram agitados para soltar as células, e 0,025 ml da suspensão contendo essas células foi transferido para uma lâmina própria para imunofluorescência (Biolab Merieux, 26 x 76 mm). A avaliação da titulação foi feita através da técnica de imunofluorescência indireta empregando-se anticorpo monoclonal específico para DENV-2 (BioManguinhos-Fiocruz, Rio de Janeiro) e Anti-IGg de camundongo conjugado com FITC (Isotiocianato de fluoresceína), produzido em cabras (SIGMA-ALDRICH). Os títulos virais (TCID<sub>50</sub>) foram calculados de acordo com Reed & Munch (1938).

### **3.3. Infecção dos mosquitos por via oral**

As fêmeas tinham aproximadamente 24h de jejum no momento da alimentação infectante. O sistema de alimentação consistia de aparato fabricado em vidro temperado (Rutledge et al. 1964; Degallier 2001), composto de duas câmaras sem comunicação entre elas: uma central, com aberturas superior e inferior, e uma periférica, com aberturas laterais para circulação de água mantida a 37°C por um Banho Maria circulante. A abertura inferior da câmara central foi coberta com uma membrana para conter o sangue infectante que foi oferecido às fêmeas.

A alimentação infectante consistia de uma suspensão viral de DENV-2 (com título viral de aproximadamente  $10^8$ TCID<sub>50</sub>), que correspondeu a 1 mL do sobrenadante da cultura de células infectadas, 1 mL de hemácias de coelho lavadas cinco vezes com

PBS a 7,2 pH e 150 uL de ATP a 0.1M. O tempo médio de exposição dos mosquitos ao repasto infectante foi de 20 minutos. O mesmo procedimento e equipe foram usados para alimentar simultaneamente os mosquitos controle da cepa Paea (Lourenco-de-Oliveira R. 2004; Maciel-de-Freitas R 2011).

Depois do repasto sanguíneo infectante, as gaiolas contendo as fêmeas expostas ao vírus foram introduzidas em uma câmara de biossegurança, onde todo o restante do procedimento foi realizado. Primeiramente, as fêmeas foram anestesiadas em banho de gelo. Em seguida, as fêmeas que não se alimentaram até a repleção foram sacrificadas e descartadas. As fêmeas ingurgitadas foram agrupadas segundo a localidade de origem em gaiolas pequenas de papelão cilíndricas devidamente teladas, mantidas durante 21 dias, com alimentação açucarada, em uma câmara de incubação com temperatura de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade de  $80\pm 10\%$  UR.

Para se verificar o título do vírus utilizado na alimentação artificial, amostras do repasto foram recolhidas logo após o término do mesmo, e congeladas à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.4. Detecção e titulação do vírus DENV-2 em mosquitos infectados experimentalmente**

Os mosquitos de todas as populações foram examinados no 14<sup>o</sup> após o repasto infectante contendo a cepa de DENV-2 isolada no Peru. Quando a população de mosquitos foi alimentada comparativamente com as cepas de DENV2 do Peru e do Brasil, os espécimes foram examinados em dois momentos: a 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias após a infecção (dpi).

A determinação da taxa de disseminação do DENV-2 foi feita a partir da detecção de RNA viral na cabeça dos mosquitos expostos ao vírus por via oral, através da técnica de RT-PCR (Lanciotti et al. 1992). A taxa de disseminação foi calculada segundo a porcentagem de mosquitos com detecção viral na cabeça (RT-PCR) do total de mosquitos expostos oralmente à infecção viral em cada população.

Além disso, foi determinado o título viral na cabeça dos mosquitos em que houve disseminação viral. Para tal, o homogenato da cabeça dos mosquitos positivos

segundo a RT-PCR foi individualmente analisado por PCR quantitativa (Johnson et al. 2005).

#### **3.4.1. Determinação da taxa de disseminação do vírus no mosquito através RT-PCR**

No 14° e 21° dias da alimentação artificial, grupos de 30 fêmeas foram mortas à baixa temperatura (-20°C), tendo sua cabeça cortada com uma lâmina de bisturi e transferida individualmente para um tubo Eppendorf, contendo 250 µl de meio L-15 e suplementado com Anfotericina e 4% Soro Fetal Bovino (SFB). Seguiu-se a maceração por 30 segundos com a ajuda de um pequeno pistilo e centrifugação a 10.000 rpm/ 5 min a 4°C, para se obter o sobrenadante.

**Extração do RNA viral.** O RNA viral foi extraído do sobrenadante de macerado de cabeça de mosquito com 14 e 21 dpi, utilizando-se o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, (Qiagen, Alemanha), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

Em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, foram adicionados 560 µL de tampão de lise AVL+5,6 µL de Carrier/AVE e 140 µL do sobrenadante do homogenato da cabeça de cada mosquito. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 560 µL de álcool etílico PA a 100% e a suspensão foi homogeneizada. Em seguida, 630 µL da mistura foram transferidos para uma coluna previamente numerada, a qual foi posta num tubo coletor. Após centrifugação por 1 min a 8000 rpm, o eluído da coluna foi desprezado. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor e os 630 µL restantes da mistura foram transferidos para a coluna, seguindo-se centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm. O eluído foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo coletor. Adicionou-se 500 µL do Tampão de lavagem AW1 e, após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm, o eluído foi descartado. Adicionaram-se 500 µL do tampão de lavagem AW2 e, após centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm, o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para novo tubo coletor, seguindo-se centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm. A coluna foi, então, transferida para um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL

previamente identificado. Adicionaram-se 60 µL de tampão de eluição (AVE) e, após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm, a coluna foi descartada e o RNA obtido foi recolhido e conservado a - 70°C.

**Reação de RT-PCR.** Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al. (1992) para a detecção e tipagem dos DENV a partir de amostras de soro e de mosquitos. Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento *semi-nested*, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos (em pares de base) para cada sorotipo dos DENV.

Em uma primeira etapa, foram utilizados iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV complementares às sequências dos genes que codificam as proteínas C e prM. No procedimento *semi-nested*, foi utilizado o iniciador específico TS2 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos DENV

Nome	Iniciador Sequência (5´- 3´)	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (pb)
D1 (+)	TCA ATA TGC TGA AAC GCG GAG AAA CCG	134 - 161	511
D2 (-)	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC	616 - 644	511
TS1 (-)	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G	568 - 586	453 (D1 e TS1)
TS2 (-)	CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	232 - 252	119 (D1 e TS2)
TS3 (-)	TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C	400 - 421	288 (D1 e TS3)
TS4 (-)	CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A	506 - 527	394 (D1 e TS4)

Para a reação de RT-PCR, 5 µL do RNA extraído e 45 µL de óleo mineral (Sigma Chemical Company) foram colocados em um tubo Eppendorf de 0,5 mL. As amostras foram aquecidas a 75°C, por 5 min, seguindo-se banho de gelo. A seguir, adicionamos 45 µL da mistura da RT-PCR (reagentes conforme o Quadro I) sob o

óleo mineral e transferimos o tubo, imediatamente, para o termociclador. Após a transcrição reversa (42°C/65 min), as amostras foram submetidas a 35 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/35 seg), anelamento (55°C/ 1 min e 6 seg), extensão (72°C/2 min e 6 seg) e um ciclo de extensão final (72°C/10 min) (Quadro II).

**Quadro I.** Reagentes utilizados na RT-PCR

Reagente	Descrição	Conc.	µl/tubo
ddH <sub>2</sub> O	Promega	–	9,8
PCR Master Mix	Promega	2X	25,0
Primer 1	D1	10 µM	1,3
Primer 2	D2	10 µM	1,3
DTT	Sigma	100 mM	2,5
AMV	RT	2,5 U/µL	0,1

**Quadro II.** Parâmetros de ciclagem da RT-PCR

RT	42°C	60 min	1 ciclo
Desnaturação	94°C	35 sec	30 ciclos
Hibridização	56°C	1 min	
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	10 min	1 ciclo
Temperatura final	4°C	Indeterminado	–

#### 3.4.1.1. Reação do Nested-PCR

Para a reação do Nested-PCR, foi utilizado novo tubo Eppendorf de 0,2 mL, onde colocamos 45 µL da mistura de Nested-PCR (reagentes conforme o Quadro III) e 5 µL da amostra do primeiro ciclo, também sob óleo mineral. As amostras foram

submetidas a 20 ciclos de desnaturação (94°C/35 seg), anelamento (55°C/1 min), extensão (72°C/2 min) e extensão final (72°C/10 min) (Quadro IV).

**Quadro III.** Reagentes utilizados no Nested-PCR

Reagente	Descrição	Conc.	µl/tubo
ddH <sub>2</sub> O	Promega	–	3,7
PCR Master Mix	Promega	2X	25,0
Primer 1	D1	10 µM	1,3
Primer 2 - 6	TS1 - TS4	20 µM	2,5

**Quadro IV.** Parâmetros de ciclagem da Nested-PCR

Desnaturação	94°C	35 sec	
Hibridização	56°C	1 min	18 ciclos
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	10 min	1 ciclo
Temperatura final	4°C	Indeterminado	–

Para a análise dos amplicons, foi realizada eletroforese à 100V por 45 min, onde 10µL do produto amplificado acrescido de 1µL de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) foi aplicado em um gel de agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 1,0X, acrescido de brometo de etídio 0,1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Em cada gel era sempre aplicado um marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*, Gibco BRL, Gaithersburg, USA), diluído 1/10 em água livre de nucleases. Além disso, eram incluídos também um controle positivo e negativo, correspondentes a produto

de PCR de amostra de RNA extraído de cultura de uma cepa de referência de DENV-2 e água, respectivamente.

### 3.4.2. Titulação do vírus DENV-2 em cabeças de mosquitos infectados experimentalmente, por RT-PCR quantitativo, sistema TAQMAN (qRT-PCR)

A concentração de RNA viral foi estimada pela quantificação absoluta do DNA complementar, realizada pela técnica de RT-PCR em uma única etapa, segundo o sistema TaqMan, onde, primeiramente ocorre a transcrição do RNA viral em DNA complementar e, posterior, amplificação deste cDNA. Utilizamos os iniciadores e a sonda marcada com os corantes 3' HEX e 5'BHQ-1 (Tabela 6), específicos para DENV-2, conforme descritos por Johnson et al. (2005). Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata em equipamento de PCR em tempo real Bioer (LineGene9660), instalado no Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

**Tabela 6.** Iniciadores utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan TM) aplicados ao DENV-2 (Johnson et al. 2005).

Iniciadores	Sequência	Posição
DENJ2-R	5- CAGGTTATGGCACTGTCACGAT-3	1605
DENJ2-F	5- CCATCTGCAGCAACACCATCTC-3	1583
DENJ2-P	HEX-5- CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA 3- BHQ-1	1008

**RT-PCR em tempo real.** A reação foi realizada conforme indicação do fabricante, com concentrações ideais dos iniciadores e sonda determinadas de acordo com o protocolo descrito por Johnson et al. (2005). Numa microplaca óptica (PE Applied Biosystems – Foster City, California, EUA), de 96 micropoços, primeiramente, foram adicionados 20µl da mistura reagente, conforme no Quadro V,

contendo os iniciadores, sonda, água e o kit SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR (Invitogen Corporation, USA) em cada poço. Logo após, acrescentavam-se 5µl do RNA extraído, obtendo-se, assim, um volume final de 25µl/reacção. Cada amostra e controles foram aplicados em duplicata. Após a montagem da placa, coloca-se um filme (*Optical Adhesive Cover*, PE Applied Biosystems – Foster City, California, EUA) na parte superior, para selagem. As placas foram lidas no aparelho para a reacção de RT-PCR em tempo real LineGene 9600 (Bioer), seguindo-se aos parâmetros de ciclagem disponíveis no Quadro VI.

O resultado das reacções de qRT-PCR foi determinado através da aferição da intensidade de fluorescência captada no sistema TaqMan™, o qual usa sondas duplamente marcadas por corantes fluorescentes distintos, degradadas pela enzima Taq polimerase durante o curso da PCR, separando os fluoróforos e propiciando a liberação da fluorescência. A fluorescência emitida é captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde o software faz a análise final dos dados. A quantidade de vírus presente nas amostras foi calculada pelos valores de Ct (do inglês *Cycle Threshold*) das amostras quando comparados aos valores de Ct da curva padrão. Por sua vez, as curvas-padrão foram feitas empregando-se uma série de diluições de amostras-padrão de RNA de DENV-2 já tituladas, sendo duas amostras de cada uma das seguintes diluições:  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  e  $10^0$ . Os valores Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo presente na amostra. Portanto, quanto mais alta for a quantidade inicial do alvo, mais cedo o produto acumulado é detectado no processo de PCR, e mais baixo é o valor do Ct. Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo software LineGene9660 da Bioer. A análise estatística, correspondente ao teste t de Student, para comparação do número de cópias do RNA viral detectado ao longo do d.p.i de cada população, foi realizada com o programa IBM SPSS Statistics versão 20. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

O número de cópias de RNA por mL quantificado segundo qRT-PCR pode ser indiretamente relacionado àquele de partículas virais infectantes na amostra analisada, ou melhor, com o número de PFU/ml (do inglês *plaque forming units per ml*), segundo Richardson et al. (2006). De acordo com este autor os valores de

PFU/ml em vírus dengue são 2-3 log<sub>10</sub> inferiores ao número de cópias de RNA/ml determinados por qRT-PCR.

**Quadro V.** Reagentes utilizados na RT-PCR em tempo real

Reagente	Conc.	µl/tubo
Reaction Mix (Invitrogen)	2X	12,5
H <sub>2</sub> O (Promega)	–	3,25
MgSO <sub>4</sub> (Invitrogen)	5 mM	1
Sonda DENJ2-P (Sigma)	9 µM	0,75
Primer DENJ2-F (Sigma)	50 µM	1
Primer DENJ2-R (Sigma)	50 µM	1
Super Script III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen)	–	0,5

Distribuir 20 µl da mistura + 5 µL do RNA.

**Quadro VI.** Parâmetros de ciclagem da RT-PCR em tempo real

RT	50°C	15 min	1 ciclo
Ativação da Enzima (Amplitaq)	95°C	2 min	1 ciclo
Desnaturação	95°C	15 seg	40 ciclos
Anelamento / Extensão	60°C	1 min	
Volume final de 25 µL			

### Meio de cultura de células

Foi utilizado o meio L-15 (Leibovitz) modificado com L-Glutamina e sem triptose fosfato (TPO<sub>4</sub>) e antibióticos, adquirindo sob forma desidratada (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

Reagente	Vol/Peso
Leibovitz 15	14,69g
Água tridestilada q.s.p.	1000,0mL

O meio foi filtrado em membrana Millipore (0,22 $\mu$ ) e, após prova de esterilidade, conservado a 4°C.

No momento da experimentação, foram adicionadas as seguintes soluções para cada 100 mL de meio:

Reagente	Vol/Peso
L-Glutamina	1,0 mL
Triptose fostato	10,0 mL
Solução de aminoácidos não essenciais/sais de Earle/vermelho de Fenol	0,5 mL
Penicilina/Estreptomicina	1,5 mL

A este meio foi adicionado soro fetal bovino SFB (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) nas concentrações de 2% ou 10%, conforme utilizado para manutenção ou crescimento celular, respectivamente.

### Tampão Salina Fosfato (Phosphatase Buffer Salt – PBS). PBS pH 7,2

Reagente	Vol/Peso
Cloreto de Sódio (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	8,0g
Cloreto de Potássio (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	0,2g
Fosfato de Sódio Dibásico 12 H <sub>2</sub> O (Vetec, RJ, BR)	2,898g
Fosfato de Potássio Monobásico (Vetec, RJ, BR)	0,2g
Água Tridestilada q.s.p.	1000,0mL

Após autoclavação a 121°C durante 20 minutos (1 atm), a solução foi conservada a 4°C.

### **ATP (*Adenosine Triphosphato*)**

<b>Reagente</b>	<b>Vol/Peso</b>
ATP 551	5,0 mg
PBS 1x pH 7,2	2,0 ml

A solução de ATP foi aliquotada em 150 uL em tubos de Ependorf e conservada a -20°C.

### **Tampão TBE 10X\***

<b>Reagente</b>	<b>Vol/Peso</b>
Trizma Base (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)	121,1g
Ácido Bórico (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)	55,6g
EDTA sal dissodico dihidratado (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	3,7g
Água destilada q.s.p.	1000mL

\* Este tampão foi utilizado 0,5X concentrado com pH 8.6 conservado a TA.

### **Gel de agarose 1% em TBE 0,5X**

<b>Reagente</b>	<b>Vol/Peso</b>
Agarose (Sigma, St. Louis, USA)	1g
Solução de TBE (0,5X)	100mL

Em um frasco Erlenmeyer, a agarose foi dissolvida em tampão TBE 0,5X, aquecendo a solução no microondas (temperatura máxima) por dois minutos. Após resfriamento da solução, adicionamos 3µL de brometo de etídio 1%. Posteriormente, a solução foi aplicada no suporte para o gel. Após endurecimento do gel, o mesmo foi acondicionado na cuba de eletroforese para posterior aplicação das amostras.

### **3.5. Testes de susceptibilidade e/ou resistência á inseticida nos mosquitos adultos**

Foram conduzidos testes de susceptibilidade e/ou resistência de populações de mosquitos *Aedes aegypti* de Tumbes e Madre de Dios frente a inseticidas piretróides e organofosforados, seguindo-se a metodologia de Brogdon & McAllister (1998). Assim, foram usadas garrafas impregnadas com soluções de inseticidas piretróides e organofosforados como ingrediente ativo (*ia*). Introduziram-se 25 fêmeas em cada uma das garrafas. Para cada teste foram utilizadas de 280 a 300 fêmeas sem prévia alimentação sanguínea. A mortalidade foi observada a cada 15 minutos sobre num período de 60 minutos, baseado no tempo letal para matar aproximadamente o 100% da população susceptível Rockefeller (tempo de diagnóstico) por cada concentração de inseticida. Assim, a mortalidade no tempo de diagnóstico é o valor que representa o limiar entre a susceptibilidade e a resistência. Para os inseticidas deltametrina e malation, o tempo de diagnóstico é de 30 minutos de acordo com Brogdon & Chan (2013) e para alfacipermetrina o tempo de diagnóstico é 30 minutos de acordo (INS-MINSA/Peru).

Para inseticidas piretróides, os mosquitos caídos aos 60 minutos foram transferidos a outro recipiente limpo, onde eram mantidos com solução de sacarose, por 24 h, para a leitura final. Para o controle, foram utilizadas garrafas impregnadas com etanol absoluto.

Os respectivos inseticidas – deltametrina, alfacipermetrina (piretroide) e malation (organofosforado) (grau técnico), foram dissolvidos em etanol absoluto em frascos à prova de luz, agitando-se a solução. Após preparação, a solução, foi conservada a 4°C. Para o revestimento dos frascos, foi adicionado 1ml da preparação dos respectivos inseticidas na concentração de 10µg/mL para deltametrina e alfacipermetrina, e 50µg/mL no caso de malation. Em seguida, o frasco foi levemente agitado de forma que toda superfície interna fosse completamente revestida e seca.

As soluções e métodos empregados nos respectivos ensaios com diferentes inseticidas acham-se descritas a seguir.

#### **Solução estoque de Deltametrina 10 $\mu$ g/mL**

<b>Reagente</b>	<b>Vol/Peso</b>
Deltametrina (do inglês <i>Deltamethrin</i> ) grau técnico. A pureza é 99,5%. Chem Service®. (West Chester, PA, USA).	10,05mg
Etanol absoluto de grau técnico Mallinckrodt®	1000mL

#### **Solução estoque de Alfacipermetrina 10 $\mu$ g/mL**

<b>Reagente</b>	<b>Vol/Peso</b>
Alfacipermetrina (do inglês <i>Alpha-Cypermethrin</i> ) grau técnico. A pureza é 99,5%. Chem Service® (West Chester, PA, USA).	10,05mg
Etanol absoluto de grau técnico Mallinckrodt®	1000mL

#### **Solução estoque de Malation 50 $\mu$ g/mL**

<b>Reagente</b>	<b>Vol/Peso</b>
Malation (do inglês <i>Malathion</i> ) grau técnico. A pureza é 98,5%. Chem Service® (West Chester, PA, USA).	50,8mg
Etanol absoluto de grau técnico Mallinckrodt®	1000mL

### **3.6. Testes estatísticos**

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para estabelecer se a distribuição de ovos coletados nas amostragens era normal. Em seguida, foi aplicado o teste T e o teste U de Mann-Whitney, ambos para duas amostras independentes, dependendo se a distribuição foi normal ou não, respectivamente. Estes testes foram usados para determinar se as diferenças entre os percentuais de ovitrampas positivas com dois tipos de suportes para oviposição foram significativas. Também foram usados para determinar se havia diferenças entre o número de ovitrampas positivas (com ovos) segundo as localidades e estação de coleta. Essa comparação foi realizada utilizando os valores médios obtidos durante o período em que as localidades foram simultaneamente estudadas. Em todos os casos, o nível de significância foi de 5%. Para a comparação das taxas de disseminação da infecção e dos valores da carga viral foi utilizado ANOVA- Kruskal Wallis, ou o teste T, quando eram amostras da mesma população de mosquito, porém testadas para mais de uma amostra viral. As comparações das taxas de disseminação da infecção entre as diferentes populações foram realizadas com o teste exato de Fisher.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Densidade de *Ae. aegypti* nas diferentes regiões climáticas e fitogeográficas do Peru com distintos históricos epidemiológicos de dengue.

Foram coletados exemplares de *Ae. aegypti* das 12 áreas escolhidas para o estudos, compreendendo amostras procedentes de todas as regiões representativas dos climas e situações fitogeográficas do Peru.

#### 4.1.1. Variáveis climáticas.

Os dados relativos aos fatores abióticos registrados durante os dias em que foram instaladas armadilhas estão apresentados na Tabela 7. Nota-se que as temperaturas médias foram semelhantes dentro de cada estação, merecendo apenas destaque as temperaturas médias ligeiramente mais baixas registradas em Junin, na selva alta (Rio Negro e Santa Leonor), influenciadas pelas temperaturas mínimas registradas ali, diferentemente do que se notou nas localidades do departamento Amazonas, ainda na selva alta, e nas demais regiões. No que diz respeito à pluviosidade, nota-se que a precipitação foi nula ou praticamente nula durante as coletas feitas na costa, em ambas as estações. Em contraste, a maior pluviosidade foi registrada na região da Amazônia, particularmente em Madre de Dios (PM7 e PM9), durante a primavera.

**Tabela 7.** Valores de temperatura máxima e mínima, de temperatura média e de precipitação total obtidas nas estações meteorológicas mais próximas das localidades onde foram realizadas as coletas de mosquitos no Peru, registradas durante os dias em que foram instaladas as armadilhas ou coletadas larvas ou pupas, no período de novembro e dezembro de 2011 e maio e julho de 2012.

Esta- ção	Localidade <sup>a</sup>	Departa- mento <sup>b</sup> / Região <sup>c</sup>	Data		Temperatura (°C)			Precipi- tação (mm)
			Instalação	Coleta	máxima	mínima	média	
Primavera	VPR - SCE	PIU/COS	29/11/2011	14/12/2011	33,3 ± 1,9	19,4 ± 0,6	26,3 ± 7,2	0,3
	BAI - LCU	TUM/COS	28/11/2011	16/12/2011	29,9 ± 1,2	22,5 ± 0,7	26,2 ± 3,9	1,1
	RNE - SLE	JUN/SAL	06/12/2011	21/12/2011	33,4 ± 2,9	17,5 ± 1,2	25,4 ± 8,4	150,3
	BGR*-BCH*	AMA/SAL	12/12/2011	17/12/2011	32,2 ± 1,7	22,9 ± 0,7	27,5 ± 5,0	52,3
	PUN - SJU	LOR/AMA	18/11/2011	30/11/2011	31,4 ± 1,7	22,9 ± 0,9	27,1 ± 4,6	66,0
	PM7 - PM9	MDD/AMA	06/12/2011	20/12/2011	30,6 ± 2,8	21,9 ± 1,0	26,3 ± 4,9	303,0
Outono	VPR - SCE	PIU/COS	29/05/2012	12/06/2012	33,2 ± 1,6	20,7 ± 0,9	27,0 ± 6,5	0,0
	BAI - LCU	TUM/COS	22/05/2012	04/06/2012	29,7 ± 0,4	22,9 ± 0,3	26,3 ± 3,5	0,0
	RNE - SLE	JUN/SAL	13/06/2012	26/06/2012	32,1 ± 1,8	11,2 ± 0,7	21,6 ± 10,7	14,6
	BGR - BCH	AMA/SAL	25/06/2012	11/07/2012	30,2 ± 1,7	21,7 ± 0,8	25,9 ± 4,5	27,4
	PUN - SJU	LOR/AMA	04/06/2012	18/06/2012	30,7 ± 2,4	21,9 ± 2,4	26,3 ± 4,9	166,4
	PM7 - PM9	MDD/AMA	05/06/2012	19/06/2012	28,5 ± 4,3	17,8 ± 3,1	23,2 ± 6,6	52,2

\*Não foram usadas armadilhas nas localidades de BGR e BCH, onde as coletas foram feitas com obtenção de larvas e pupas em criadouros. <sup>a</sup>As localidades foram agrupadas por departamento. VPR: Villa Primavera; SCE: Sanchez Cerro; BAI: Buenos Aires; LCU :La Curva; RNE:Rio Negro; SLE: Santa Leonor; BGR: Bagua Grande; BCH: Bagua Chica; PUN :Punchana; SJU:San Juan; PM7:Puerto Maldonado setor 7; PM9: Puerto Maldonado setor 9; <sup>b</sup> PIU: Piura; TUM: Tumbes; AMA: Amazonas; JUN: Junin; LOR: Loreto; MDD: Madre de Dios. <sup>c</sup> COS: costa, SAL: selva alta; Amazônia.

#### **4.1.2. Densidade de *Ae. aegypti* das localidades de estudo**

Exceto nas localidades do Departamento de Amazonas (BGR e BCH), durante a primavera, onde só foi possível amostrar mosquitos em criadouros, as demais amostragens foram feitas a partir de ovos coletados em armadilha de oviposição instaladas na primavera de 2011 e no outono de 2012.

Ao todo, foram coletados 16.906 ovos de *Ae. aegypti*, sendo 8.792 (52,0%) na Amazônia, 4.933 (29,2%) na região da Costa e 3.181 (18,8%) na Selva Alta (Tabela 8). Na região da costa, as localidades não diferiram essencialmente quanto ao total de ovos coletados, variando de 1.096 em SCE a 1.300 em BAI. Contudo, tanto na região da Amazônia quanto na selva alta, houve heterogeneidade no número de ovos coletados no total das amostragens, sendo PUN (3.394 ovos coletados) e SJU (2.366) as localidades onde as coletas foram mais rendosas na Amazônia, e SLE (1.055) e RNE (928) aquelas onde se coletaram mais ovos na selva alta, com a ressalva de que não foram instaladas armadilhas nas localidades de BGR e BCH durante a primavera (Tabela 8).

**Tabela 8.** Amostras de *Ae. aegypti* provenientes de 12 localidades, coletadas na primavera de 2011 e no outono de 2012 com armadilhas de oviposição.

Esta- ções	Dados	Costa					Amazônia					Selva Alta					Total
		VPR	SCE	BAI	LCU	sub-t	PUN	SJU	PM7	PM9	sub-t	RNE	SLE	BGR	BCH	sub-t	
Primavera	N° ovos	613	454	633	934	2634	1566	1284	809	1299	4958	648	1019	NR	NR	1667	9259
	Min - Max	0 89	0 166	0 184	0 305		0 413	0 271	0 160	0 189		0 299	0 204	NR	NR		
	Média* - D. padrão	15,3 21,7	11,4 28,1	15,8 44,3	23,4 68,5		41,2 74,1	32,1 52,8	21,9 35,5	31,7 44,4		18,5 54,8	30,3 49,6	NR	NR		
	% ovitrampas positivas	55,0 (22/40)	40,0 (16/40)	20,0 (8/40)	24,4 (10/41)		71,1 (27/38)	52,5 (21/40)	51,4 (19/37)	56,1 (23/41)		20,0 (7/35)	45,7 (16/35)	NR	NR		
	% Perdas	0,0	0,0	0,0	0,0		5,3	0,0	8,1	0,0		14,0	14,0	NR	NR		
Outono	N° ovos	685	642	667	305	2299	1828	1082	492	432	3834	280	36	656	542	1514	7647
	Min - Max	0 268	0 138	0 172	0 66		0 284	0 212	0 222	0 119		0 79	0 22	0 141	0 135		
	Média* - D. padrão	17,1 50,3	16,1 32,9	16,7 36,3	7,6 16,8		45,7 69,0	27,1 42,9	13,0 40,3	10,3 25,8		7,0 18,0	0,9 4,1	16,4 36,2	13,6 29,1		
	% ovitrampas positivas	30,0 (12/40)	47,5 (19/40)	35,0 (14/40)	20,0 (8/40)		60,0 (24/40)	60,0 (24/40)	38,5 (15/39)	29,3 (12/41)		30,0 (12/40)	15,0 (6/40)	25,0 (10/40)	45,0 (18/40)		
	% Perdas	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	3,6	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0		
<b>Total de ovos</b>		1298	1096	1300	1239	4933	3394	2366	1301	1731	8792	928	1055	656	542	3181	<b>16906</b>
<b>% ovos</b>							29,2				52,0				18,8		

\*Média e desvio padrão do número de ovos coletados por ovitrampa; NR: Não realizado (as coletas foram feitas com obtenção de larvas e pupas em criadouros); Min-Max: número de ovos mínimos e máximos por ovitrampa; VPR: Villa Primavera; SCE: Sanchez Cerro; BAI: Buenos Aires; LCU: La Curva; RNE: Rio Negro; SLE: Santa Leonor; BGR: Bagua Grande; BCH: Bagua Chica; PUN: Punchana; SJU: San Juan; PM7: Puerto Maldonado setor 7; PM9: Puerto Maldonado setor 9; sub-t: Sub-total.

### 4.1.3. Índices de positivities das ovitrampas (IPO)

Os índices de positividade de armadilhas para ovos de *Ae. aegypti* foi elevado, independente da época do ano, localidade ou região, apontando para uma frequência elevada deste mosquito nas diferentes áreas do país. Contudo, houve grande heterogeneidade neste indicador, seja quanto ao local seja quanto a época da amostragem (Tabelas 8 e 9), como veremos a seguir.

Na primavera, foram recuperadas 387 ovitrampas das 402 instaladas (3,7% de perdas), perfazendo um total de 169 ovitrampas positivas (43,7%). Já no outono, foram recuperadas 480 ovitrampas das 481 instaladas (0,2% perdas), perfazendo um total de 174 positivas (36,2%). A comparação entre a positividade das armadilhas de oviposição na primavera e outono demonstrou diferenças significativas (Teste t para igualdade de médias,  $t = 2,644$   $p = 0,008$ ) (Tabela 9).

Desconsiderando-se as estações do ano, os índices totais de positividade das ovitrampas variaram de 22,2% a 65,4%, sendo o maior deles o observado na localidade de Punchana, que fica situada na região da amazônia, enquanto o menor foi registrado na localidade La Curva, da região costa (Tabela 9). Porém, quando comparamos o número de ovos coletados em cada localidade segundo a estação, verificamos que em seis localidades, o percentual de ovitrampas positivas foi maior na primavera que no outono (Tabela 8). Destas, em três localidades o percentual de armadilhas positivas foi significativamente maior na primavera, destacando-se a queda considerável neste índice observada em SLE, na região de selva alta, onde a positividade de ovitrampas caiu de 45,7% na primavera para 15% no outono (teste t,  $p = 0,000$ ), o mesmo aconteceu em Villa Primavera, na costa, e Puerto Maldonado 9, na amazônia (Teste U de Mann Whitney,  $p = 0,025$  e  $p = 0,012$ , respectivamente) (Tabela 8).

Considerando-se a região fitogeográfica peruana, notamos que as coletas feitas na amazônia foram em geral mais abundantes. O percentual de armadilhas positivas para ovos chegou a índices alarmantes como o verificado em Punchana (71,1%), mas esteve acima de 50% nas demais localidades desta região, na

primavera. Estes dados sugerem também que o mosquito vetor acha-se bastante disseminado espacialmente dentro de cada localidade amazônica amostrada (Tabela 8).

**Tabela 9.** Índice geral de positividade de ovitrampas para ovos de *Ae. aegypti* segundo a localidade e estação de amostragem, primavera de 2011 e no outono de 2012, no Peru.

Região	Departamento	Localidade	Índice ovi pos IPO (ovi pos / ovi total)	Estação					
				Primavera ovitrampas			Outono ovitrampas		
				pos	rec	ins	pos	rec	ins
<b>Costa</b>	Piura	Villa Primavera	42,5 (34 / 80)	22	40	40	12	40	40
		Sanchez Cerro	43,8 (35 / 80)	16	40	40	19	40	40
	Tumbes	Buenos Aires	27,5 (22 / 80)	8	40	40	14	40	40
		La Curva	22,2 (18 / 81)	10	41	41	8	40	40
<b>Selva Alta</b>	Amazonas	Bagua Grande	25,0 (10 / 40)	NR	NR	NR	10	40	40
		Bagua Chica	45,0 (18 / 40)	NR	NR	NR	18	40	40
	Junin	Rio Negro	25,3 (19 / 75)	7	35	40	12	40	40
		Santa Leonor	29,3 (22 / 75)	16	35	40	6	40	40
<b>Amazônia</b>	Loreto	Punchana	65,4 (51 / 78)	27	38	40	24	40	40
		San Juan	56,3 (45 / 80)	21	40	40	24	40	40
	Madre de Dios	Pto. Maldonado Sector 7	44,7 (34 / 76)	19	37	40	15	39	40
		Pto. Maldonado Sector 9	42,7 (35 / 82)	23	41	41	12	41	41
		<b>Total</b>		169	387	402	174	480	481
				Porcentual de ovi pos			43,7		36,2
				Porcentual de perdas			3,7		0,2

Pos: número de ovitrampas positivas; rec: número de ovitrampas recuperadas; ins: número de ovitrampas instaladas; ovi pos: ovitrampas positivas; NR: Não realizado coleta com armadilha; as coletas foram feitas com obtenção de larvas e pupas em criadouros.

#### **4.1.4. Índice de densidade de ovos (IDO) de *Ae. aegypti* segundo a localidade peruana.**

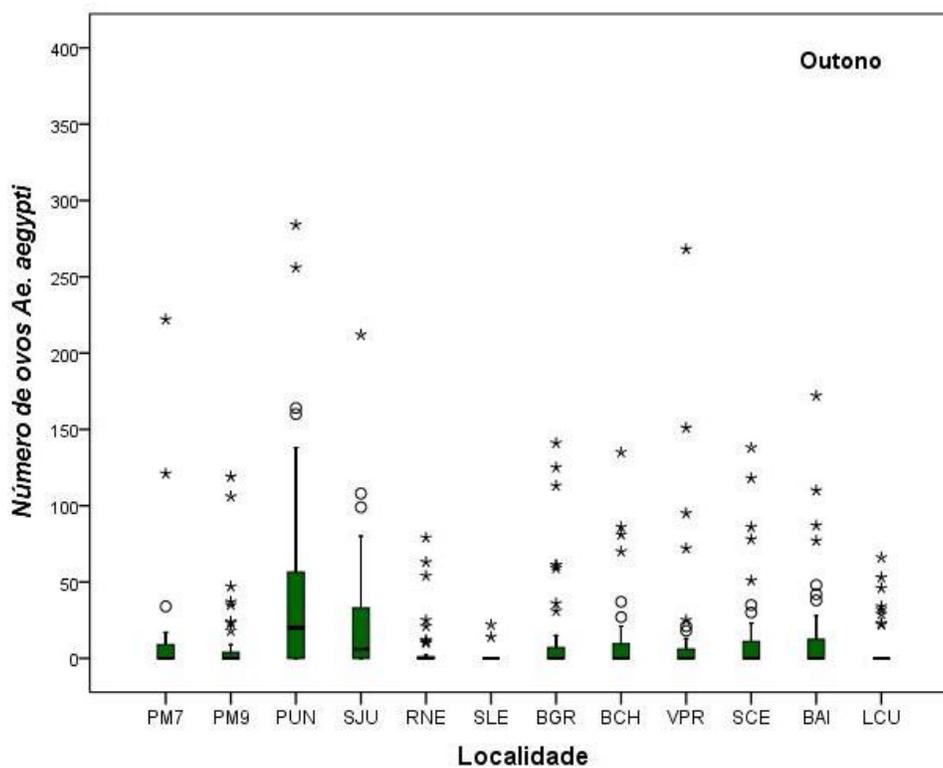
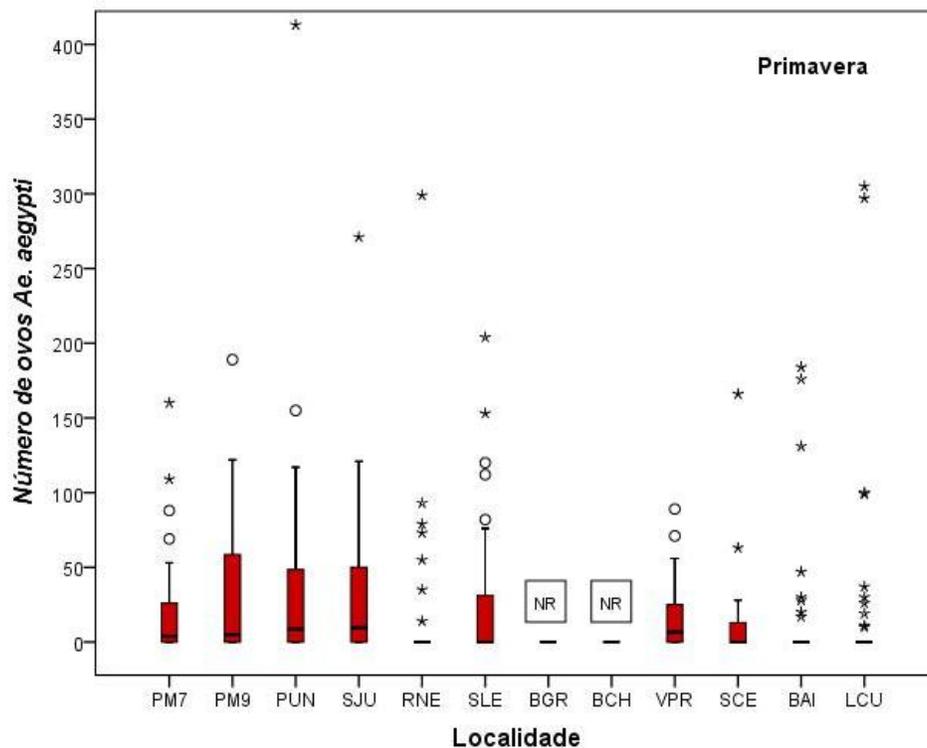
Os índices de densidade de ovos, que corresponde ao número ovos encontrado por armadilha positiva, variaram, no total de coletas, de 68,8, em La Curva, que fica situada na região da costa norte, a 30,1 em Bagua Chica, na região de selva alta. Estes IDOs indicam elevada frequência do vetor *Ae. aegypti* no país, a despeito da região e estação. Na primavera, foram contabilizados 9.259 ovos de *Ae. aegypti* em 169 ovitrampas examinadas. Já no outono, foram encontrados 7.647 ovos em 174 ovitrampas examinadas. A comparação entre o IDO das armadilhas de oviposição na primavera e outono demonstrou diferenças significativas ( $t = 2,719$   $p = 0,007$ ) (Tabela 10).

Quando dissecamos este dado geral segundo a localidade e estação do ano (Tabelas 9 e 10; Figura 13), observamos grande heterogeneidade no IDO entre localidades. Por exemplo, no outono, em Santa Leonor, encontraram-se apenas 36 ovos nas 6 armadilhas positivas no outono (média de 6 ovos por armadilha), contabilizaram-se mais que 10 vezes o número de ovos por armadilha em Bagua Grande [656 ovos em 10 armadilhas (65,6)], na mesma região de selva alta, e em Punchana [1.828 ovos em 24 armadilhas (76,2)] (Tabela 10).

**Tabela 10.** Índices de densidade de ovos de *Ae. aegypti* em 12 localidades peruanas, nas estações da primavera de 2011 e do outono 2012.

Região	Departamento	Localidade	Índice de Densidade de Ovos IDO (N° ovos / N° ovi pos)	Estação			
				Primavera		Outono	
				N° ovos	ovi pos	N° ovos	ovi pos
<b>Costa</b>	Piura	Villa Primavera	38,2 (1298/34)	613	22	685	12
		Sanchez Cerro	31,3 (1096/35)	454	16	642	19
	Tumbes	Buenos Aires	59,1 (1300/22)	633	8	667	14
		La Curva	68,8 (1239/18)	934	10	305	8
<b>Selva Alta</b>	Amazonas	Bagua Grande	65,6 (656/10)	NR	NR	656	10
		Bagua Chica	30,1 (542/18)	NR	NR	542	18
	Junin	Rio Negro	48,8 (928/19)	648	7	280	12
		Santa Leonor	48,0 (1055/22)	1019	16	36	6
<b>Amazônia</b>	Loreto	Punchana	66,5 (3394/51)	1566	27	1828	24
		San Juan	52,6 (2366/45)	1284	21	1082	24
	Madre de Dios	Pto. Maldonado Sector 7	38,3 (1301/34)	809	19	492	15
		Pto. Maldonado Sector 9	49,5 (1731/35)	1299	23	432	12
		<b>Total</b>			9259	169	7647

N° ovos: número de ovos; ovi pos: ovitrampas positivas. NR: Não foram usadas armadilhas, as coletas foram feitas com obtenção de larvas e pupas em criadouros.



**Figura 13.** Número de ovos de *Ae. aegypti* por ovitrapa nas 12 localidades peruanas amostradas, na primavera de 2011 e outono de 2012. NR: Não foram usadas armadilhas; as coletas foram feitas com obtenção de larvas e pupas em criadouros. Boxplot indicando mediana (linha horizontal). Os asteriscos e bolas indicam observações discrepantes.

#### **4.1.5. Produtividade na coleta de ovos de *Ae. aegypti* por tipo de suporte instalado na armadilha de oviposição (ovitrampa)**

Ao todo foram coletados 8.134 (48,1%) ovos no suporte de papel e 8.772 (51,9%) em madeira. Em geral, não foi observada diferença significativa na eficiência destes dois suportes para a coleta de ovos quando considerado o número de ovos conseguidos no total das coletas (teste U de Mann-Whitney de duas amostras independentes;  $p = 0,921$ ) (Tabela 11).

Na primavera, de 191 ovitrampas com suporte de papel, 80 foram positivas (41,9%), totalizando 4.054 ovos, enquanto de 196 ovitrampas com suporte de madeira, 89 ovitrampas foram positivas (45,4%), totalizando 5.205 ovos. No outono, de 239 ovitrampas com suporte de papel, 89 foram positivas (37,2%) totalizando 4.080 ovos, enquanto de 241 ovitrampas com suporte de madeira, 85 foram positivas (35,3%), totalizando 3.567 ovos. Não houve diferença quanto ao número de ovos coletados nas localidades, por estação, segundo o suporte para a coleta, exceto em Santa Leonor, onde houve diferença entre coletas feitas das diferentes estações independente do suporte usado na armadilha, e em Puerto Maldonado 7 e 9, onde houve diferença na produtividade entre primavera e outono, quando o suporte era madeira (Tabela 12).

**Tabela 11.** Densidade de ovos de *Ae. aegypti* por tipo de suporte usado na armadilha, em 12 localidades peruanas, nas estações da primavera de 2011 e do outono 2012.

Localidade	N° ovos (tipo de suporte para ovos)					
	Papel			Madera		
	Primavera	Outono	Teste U	Primavera	Outono	Teste U
VPR	256	289	U=147,500, p=0,055	357	396	U=154,000, p=0,088
SCE	195	352	U=186,500, p=0,347	259	290	U=156,000, p=0,098
BAI	273	454	U=214,000, p=0,150	360	213	U=133,500, p=0,225
LCU	375	225	U=177,000, p=0,315	559	80	U=179,000, p=0,103
RNE	49	104	U=158,000, p=0,376	599	176	U=177,000, p=0,468
SLE	241	14	<b>U=132,000, p=0,012</b>	778	22	<b>U=62,000, p=0,000</b>
BGR	NR	656	NA	NR	0	NA
BCH	NR	213	NA	NR	329	NA
PUN	429	279	U=117,000, p=0,346	1137	1549	U=241,000, p=0,304
SJU	913	727	U=198,500, p=0,486	371	355	U=197,000, p=0,469
PM7	438	421	U=161,500, p=0,276	371	71	<b>U=111,000, p=0,024</b>
PM9	885	346	U=163,500, p=0,057	414	86	<b>U=124,000, p=0,006</b>
Total	4054	4080	8134	5205	3567	8772
Porcentual	43,8	53,3	48,1	56,2	46,4	51,9

VPR:Villa Primavera; SCE:Sanchez Cerro; BAI:Buenos Aires; LCU:La Curva; RNE:Rio Negro; SLE:Santa Leonor; BGR:Bagua Grande; BCH:Bagua Chica; PUN:Punchana; SJU:San Juan; PM7:Puerto Maldonado setor 7; PM9: Puerto Maldonado setor 9. Teste U de Mann Whitney para duas amostras independentes,  $p > 0,05$ .

O percentual de ovitrampas positivas por tipo de suporte para desova de *Ae. aegypti* não mostrou diferença significativa na maioria das localidades, exceto nas localidades de Santa Leonor e Bagua Grande, em que se coletaram mais ovos com o suporte de madeira na primavera e com suporte de papel no outono, respectivamente (Tabela 13).

**Tabela 12.** Ovitrampas positivas para ovos de *Ae. aegypti* por tipo de suporte usado na armadilha, em 12 localidades peruanas, nas estações da primavera de 2011 e do outono 2012.

Localidade	Primavera			Outono		
	Percentual ovi pos (N° ovi pos/total ovi)			Percentual ovi pos (N° ovi pos/total ovi)		
	Papel	Madeira	U de Mann Whitney	Papel	Madeira	U de Mann Whitney
VPR	55,0 (11/20)	55,0 (11/20)	U=157,000, p=0,651	25,0 (5/20)	35,0 (7/20)	U=184,500, p=0,605
SCE	50,0 (10/20)	30,0 (6/20)	U=169,000, p=0,344	35,0 (7/20)	60,0 (12/20)	U=170,500, p=0,388
BAI	26,0 (6/23)	11,8 (2/17)	U=173,500, p=0,389	41,0 (9/22)	27,8 (5/18)	U=168,500, p=0,346
LCU	26,0 (5/19)	22,7 (5/22)	U=198,000, p=0,957	30,0 (6/20)	10,0 (2/20)	U=162,000, p=0,141
RNE	12,0 (2/17)	27,8 (5/18)	U=123,500, p=0,163	20,0 (4/20)	40,0 (8/20)	U=163,000, p=0,217
SLE	29,0 (5/17)	61 (11/18)	<b>U=89,000, p=0,023</b>	5,0 (1/20)	25,0 (5/20)	U=198,000, p=0,914
BGR	NR	NR	NR	50,0 (10/20)	0,0 (0/20)	<b>U=100,000, p=0,006</b>
BCH	NR	NR	NR	50,0 (10/20)	40,0 (8/20)	U=187,500, p=0,738
PUN	67,0 (10/15)	73,9 (17/23)	U=151,500, p=0,525	52,9 (9/17)	65,2 (15/23)	U=131,000, p=0,068
SJU	55,0 (11/20)	50,0 (10/20)	U=170,000, p=0,390	65,0 (13/20)	55,0 (11/20)	U=162,500, p=0,294
PM7	47,0 (9/19)	55,6 (10/18)	U=157,000, p=0,651	40,0 (8/20)	36,8 (7/19)	U=164,000, p=0,585
PM9	52,0 (11/21)	60,0 (12/20)	U=192,500, p=0,633	35,0 (7/20)	23,8 (5/21)	U=191,000, p=0,352
Total	80/191	89/196	169/387	89/239	85/241	174/480
Porcentual	41,9	45,4		37,2	35,3	

Ovi pos: ovitrampas positivas. Teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes. Significância 5%. NR: Não foram usadas armadilhas, as coletas foram feitas com obtenção de larvas e pupas em criadouros. VPR: Villa Primavera; SCE: Sanchez Cerro; BAI: Buenos Aires; LCU: La Curva; RNE: Rio Negro; SLE: Santa Leonor; BGR: Bagua Grande; BCH: Bagua Chica; PUN: Punchana; SJU: San Juan; PM7: Puerto Maldonado setor 7; PM9: Puerto Maldonado setor 9. Teste U de Mann Whitney para duas amostras independentes,  $p > 0,05$ .

## 4.2. Avaliação da competência vetorial de populações peruanas de *Aedes aegypti* com DENV-2 isolado do Peru.

### 4.2.1. Seleção e titulação das amostras de DENV-2 isoladas do Peru e do Brasil para fines de infecção experimental de *Ae. aegypti*.

Quatro amostras de DENV-2 isoladas de casos clínicos de dengue e de mosquito *Ae. aegypti*, confirmadas laboratorialmente através de IFA, foram inoculadas em cultura de células de *Ae. albopictus* clone C6/36 em sucessivas passagens para serem subsequentemente tituladas. A titulação viral foi feita na quarta passagem para as cepas HAI 212, do Peru e 935/1274, do Brasil, na sexta passagem para a cepa brasileira 6344, e nona passagem para a cepa 16681, também do Brasil. As amostras HAI 212 e 935/1274 foram a que apresentaram maiores e semelhantes títulos na mais baixa passagem e foram, por isso, escolhidas para uso em todos os experimentos (Tabela 13).

**Tabela 13.** Titulação de vírus DENV-2 de Peru e Brasil, obtidos de casos clínicos e de mosquito no Laboratório de Flavivírus, após sucessivas passagens em cultura de células *Ae. albopictus* clone C6/36.

País	Origem	Código	Passagem #	Data	*Título
Perú	Humano	HAI 212	4	12/03/12	$10^{6,76}/0,1\text{ml}$ - $10^{7,76}/1,0\text{ml}$ .
Brasil	Humano	63444	6	16/05/12	$10^{8,50}/0,1\text{ml}$ - $10^{9,50}/1,0\text{ml}$
Brasil	Humano	16681	9	16/05/12	$10^{8,00}/0,1\text{ml}$ - $10^{9,00}/1,0\text{ml}$
Brasil	Mosquito	935/1274	4	16/05/12	$10^{7,66}/0,1\text{ml}$ - $10^{8,66}/1,0\text{ml}$

\* Titulação em cultura de células C6/36, TCID<sub>50</sub> (dose infectante pela cultura de tecidos 50%)

#### **4.2.2. Obtenção das fêmeas de *Ae. aegypti* destinadas aos experimentos de determinação da competência vetorial.**

A Tabela 14 resume os dados relativos às coletas de formas imaturas nas diferentes localidades peruanas visando-se a obtenção de mosquitos para as infecções experimentais.

Vale ressaltar o fato de que os experimentos de determinação da competência vetorial foram realizados com fêmeas da geração F2, procedentes das coletas feitas na primavera. Ainda merece destaque lembrar que se escolheu, ao acaso, uma população representativa de cada um dos seis departamentos amostrados, cada qual representante de cada uma das três regiões climáticas e fitogeográficas do Peru, sendo: Sanchez Cerro (Piura) e La Curva (Tumbes), da região costeira, Rio Negro (Junin) e Bagua Grande (Amazonas), da região da selva alta, e Punchana (Loreto) e Puerto Maldonado 7 (Madre de Dios), na região amazônica.

Consideramos que a amostra utilizada nos experimentos tem grande chance de representar a variabilidade genética dentro de cada população de *Ae. aegypti* considerando-se o número adequado de progenitores coletados no campo e utilizados na colônia, geralmente acima de 100 indivíduos, exceto em Rio Negro (N=85). O número de indivíduos fundadores da colônia chegou a 1.114, em Punchana. Ainda neste sentido, merece destaque o fato de que o percentual de armadilhas de oviposição positivas e que forneceram os ovos que originaram os indivíduos fundadores das respectivas colônias foi geralmente elevado: 71,1% em Punchana, 51,4% em Porto Maldonado 7, 40% em Sanchez Cerro, 24,4% em La Curva, e 20% em Rio Negro (Tabelas 8 e 14) (a amostragem em Bagua Grande foi feita com coleta de larvas e pupas). Uma vez que as armadilhas foram bastante distribuídas espacialmente em cada localidade, esses resultados indicam grande probabilidade de que os indivíduos testados representem a variedade genética dos mosquitos selvagens de cada local.

**Tabela 14.** Número de *Ae. aegypti* adultos, fêmeas e machos, da geração F0 obtida nas respectivas localidades e que deram origem à colônia de onde foram amostrados os indivíduos empregados nos experimentos de infecção oral com vírus dengue.

Região	Dpto	Localidade	Estação	Data	Estadio coletado	Prog ♀♂	Geração testada
<b>Costa</b>	Piura	Sanchez Cerro	Primavera	Nov-Dez/11	Ovos	231	F2
		Villa Primavera	Primavera	Nov-Dez/11	Ovos	238	F2
	Tumbes	La Curva	Primavera	Nov-Dez/11	Ovos	154	F2
		Buenos Aires	Primavera	Dez/11	Ovos	158	F2
<b>Selva Alta</b>	Junin	Rio Negro	Primavera	Dez/11	Ovos	85	F2
		Santa Leonor	Primavera	Dez/11	Ovos	276	F2
	Amazonas	Bagua Grande	Primavera	Dez/11	Larva e pupa	123	F2
		Bagua Chica	Primavera	Dez/11	Larva e pupa	115	F2
<b>Amazônia</b>	Loreto	Punchana	Primavera	Nov/11	Ovos	1114	F2
		San Juan	Primavera	Nov/11	Ovos	818	F2
	Madre de Dios	Pto. Mald. 9	Primavera	Nov-Dez/11	Ovos	425	F2
		Pto. Mald. 7	Primavera	Nov-Dez/11	Ovos	358	F2
<b>Costa</b>	Piura	La Curva	Outono	Mai/12	Ovos	61	F1
		Buenos Aires	Outono	Mai/12	Ovos	309	F1
	Tumbes	Sanchez Cerro	Outono	Mai-Jun/12	Ovos	35	F1
		Villa Primavera	Outono	Mai-Jun/12	Ovos	116	F1
<b>Selva Alta</b>	Junin	Bagua Grande	Outono	Jun-Jul/12	Ovos	185	F1
		Bagua Chica	Outono	Jun-Jul/12	Ovos	330	F1
	Amazonas	Rio Negro	Outono	Jun/12	Ovos	92	F1
		Santa Leonor	Outono	Jun/12	Ovos	24	F1
<b>Amazônia</b>	Loreto	Punchana	Outono	Jun/12	Ovos	1565	F1
		San Juan	Outono	Jun/12	Ovos	976	F1
	Madre de Dios	Pto. Mald. 9	Outono	Jun/12	Ovos	283	F1
		Pto. Mald. 7	Outono	Jun/12	Ovos	239	F1

Dpto: Departamento; Prog: Progenitores oriundo de coletas no campo.

#### **4.2.3. Taxas de disseminação de DENV-2 procedente do Peru em populações peruanas de *Ae. aegypti***

Foi examinada uma amostra composta por 180 fêmeas de *Ae. aegypti* procedentes de seis localidades do Peru dentre as oralmente expostas a uma cepa de DENV-2 isolada do Peru (Tabela 15).

Todas as populações testadas mostraram-se suscetíveis ao DENV-2. No entanto, as taxas de disseminação foram heterogêneas, observando-se diferença significativa quando todas as populações peruanas foram consideradas em conjunto ( $p < 0,05$ ) (Tabela 15 e Figura 14).

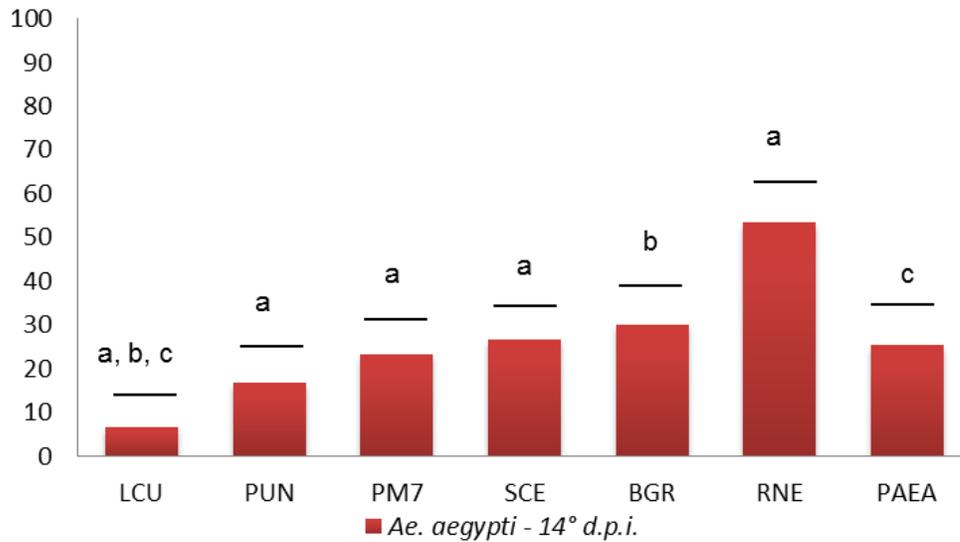
As taxas de disseminação variaram entre 6,7%, em La Curva (LCU), localidade da costa norte e de clima árido, a 53% em Rio Negro, da selva alta e clima chuvoso, quente e úmido. Na maioria das populações peruanas de *Ae aegypti*, as taxas de disseminação foram consideráveis, já que em quatro das seis populações, RNA viral foi detectado na cabeça de mais de 23% dos indivíduos. Quando comparamos as taxas de disseminação pareadas, foram detectadas diferenças significativas entre a taxa observada para Rio Negro e aquelas das seguintes amostras: Puerto Maldonado setor 7, Punchana, La Curva e Sanchez Cerro ( $p = 0,016$ ;  $p = 0,003$ ;  $p = 0,000$ ;  $p = 0,032$ , respectivamente). A taxa de disseminação observada para a amostra de Bagua Grande também foi diferente da verificada para La Curva ( $p = 0,032$ ) (Tabela 15 e Figura 14).

Quando as taxas de disseminação das populações peruanas foram comparadas com as observadas para a população controle (cepa Paea), apenas uma amostra foi significativamente diferente (LCU,  $p = 0,026$ ) (Tabela 15 e Figura 14).

**Tabela 15.** Taxas de disseminação, em ordem crescente, de DENV-2 procedente do Peru em populações peruanas de *Ae. aegypti* examinadas 14 dias após serem oralmente expostas ao vírus. O número de fêmeas examinadas acha-se entre parêntesis.

Regiões	Localidade	Percentuais de fêmeas infectadas (N) <sup>a</sup>		*p
		Amostras peruanas	Controle (cepa Paea)	
Costa	La Curva	6,7 (30)	40,0 (10)	0,026
Amazônia	Punchana	16,7 (30)	40,0 (10)	0,138
Amazônia	Puerto Maldonado setor 7	23,3 (30)	10,0 (10)	0,341
Costa	Sanchez Cerro	26,7 (30)	10,0 (10)	0,266
Selva Alta	Bagua Grande	30,0 (30)	20,0 (10)	0,432
Selva Alta	Rio Negro	53,3 (30)	33,3 (9)	0,252

Taxa de disseminação é a percentagem de mosquitos com vírus detectados em amostras de cabeça dentre aqueles expostos oralmente ao DENV-2 através de RT-PCR. \*p: probabilidade de homogeneidade segundo teste exato de Fisher,  $p < 0,05$ .



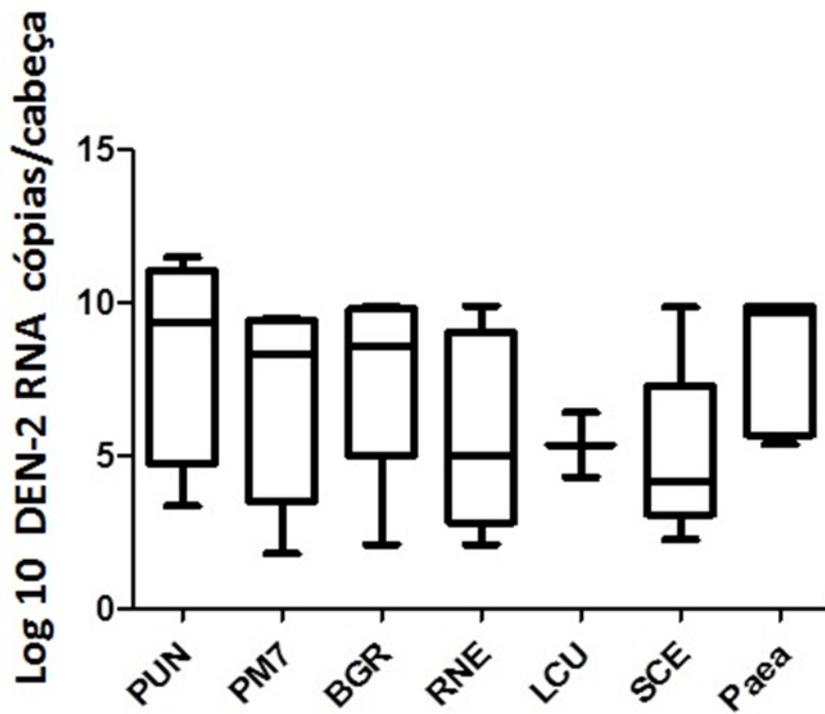
**Figura 14.** Taxa de disseminação (porcentagem de mosquitos com RNA viral detectado na cabeça através de RT-PCR) em seis populações peruanas de *Ae. aegypti* e na cepa Paea (controle de infecção), oralmente expostas ao DENV-2 procedente do Peru, examinadas no 14° d.p.i. LCU: La Curva; PUN: Punchana; PM7: Puerto Maldonado setor 7; SCE: Sanchez Cerro; BGR: Bagua Grande; RNE: Rio Negro. As barras representam a média dos experimentos independentes (n = 30 cabeças de mosquitos) e as letras a, b e c apresentam diferença significativa segundo teste exato de Fisher,  $p < 0,05$ .

Objetivando-se avaliar se houve heterogeneidade na taxa de disseminação entre amostras de *Ae. aegypti* originários de uma mesma região, agrupamos e comparamos os resultados (teste exato de Fisher) de acordo com três regiões ou tipo de biótopo. Não houve diferença significativa entre as duas amostras da amazônia (PUN e PM7;  $p = 0,374$ ) e nem entre as duas amostras da selva alta (BGR e RNE;  $p = 0,058$ ). No entanto, a taxa de disseminação diferiu significativamente entre as duas amostras da costa norte (LCU e SCE;  $p = 0,040$ ).

#### **4.2.4. Título viral na cabeça de fêmeas peruanas de *Ae. aegypti* em que houve disseminação de DENV-2 procedente do Peru.**

A determinação da carga viral foi feita em número diferente de indivíduos de cada população, pois se considerou avaliar este parâmetro apenas nos indivíduos em que houve confirmação da disseminação viral segundo resultado de RT-PCR da cabeça dos indivíduos oralmente expostos ao DENV-2 isolado no Peru. Assim, foram determinados os títulos virais na cabeça de 12 indivíduos de RNE a 2 indivíduos de LCU (Figura 15).

A mediana do título viral esteve em torno de  $10 \log_{10}$  nas populações experimentais de PUN, PM7 e BGR, assim como na população controle PAEA, e próximo de  $5 \log_{10}$  nas populações RNE, LCU e SCE (Figura 14). Os números de cópias de RNA detectado na cabeça dos mosquitos em que houve disseminação viral do DENV-2 procedente do Peru variaram consideravelmente, sendo valores máximos e mínimos detectados os seguintes, respectivamente: PUN =  $3,74 \times 10^1$  e  $5,00 \times 10^9$ , PM7 =  $9,90 \times 10^0$  e  $5,11 \times 10^7$ , BGR =  $2,31 \times 10^1$  e  $1,24 \times 10^8$ , RNE =  $2,62 \times 10^0$  e  $1,27 \times 10^8$ , SCE =  $3,22 \times 10^0$  e  $1,15 \times 10^8$  e LCU  $3,23 \times 10^2$  e  $4,26 \times 10^4$ . Contudo, não houve diferença significativa entre os títulos virais determinados pela qRT-PCR registrados para as populações peruanas analisadas (teste Kruskal - Wallis  $p = 0,6015$ ). Quanto a cepa Paea de *Ae. aegypti* usada como controle de infecção, os títulos virais na cabeça dos indivíduos em que houve disseminação também não diferiram estatisticamente daqueles verificados para as seis populações peruanas ( $p = 0,2015$ ; teste Kruskal- Wallis), sendo o valor mínimo de  $1,26 \times 10^2$  e máximo de  $1,32 \times 10^8$ .



**Figura 15.** Quantificação da carga viral de DENV-2 originários do Peru em números de cópias de RNA em homogenato da cabeça (Log 10) de mosquitos peruanos e a da cepa Paea de *Ae. aegypti* no 14° d.p.i.

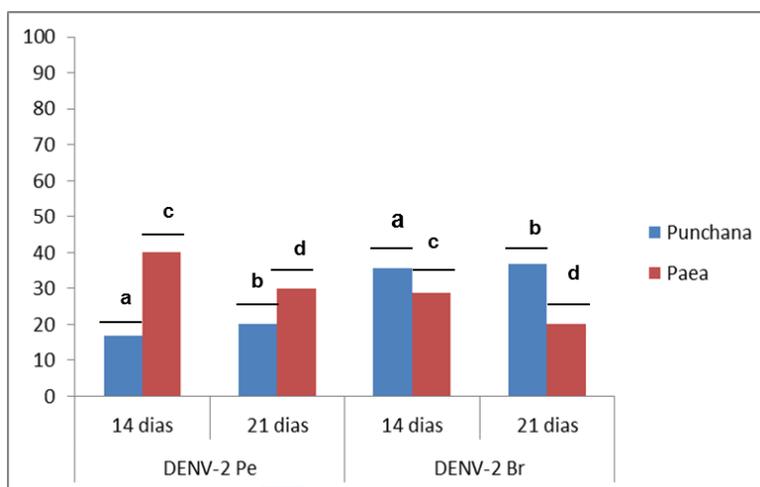
### **4.3. Competência vetorial comparativa de *Ae. aegypti* procedente do Peru expostos oralmente a DENV-2 isolados do Peru e do Brasil**

Os resultados mostrados na Tabela 16 e Figura 16 sugerem que *Ae. aegypti* peruanos originários de Punchana apresentam uma disseminação menos eficiente para DENV-2 isolado do Peru (DENV-2 Pe) que para DENV-2 isolado do Brasil (DENV-2 Br), quando expostas oralmente a esses isolados virais com o mesmo título. Assim, quando avaliadas aos 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> d.p.i., as taxas de disseminação foram de 16,7% e 20,0% para DENV-2 Pe, e de 35,5% e 36,7 para o DENV-2 Br. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas seja entre as taxas de disseminação entre as duas cepas virais nos mosquitos peruanos (Teste exato de Fisher  $p = 0,083$  e  $p = 0,126$ , respectivamente), seja entre os períodos de incubação, ou seja, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> d.p.i. nos isolados DENV-2 Pe e DENV-2 Br (Teste exato de Fisher's  $p = 0,500$  e  $p = 0,537$ , respectivamente).

Já com mosquitos da cepa Paea de *Ae. aegypti*, procedentes de uma colônia mantida prolongadamente em laboratório, as taxas de disseminação para o DENV-2 Pe foram ligeiramente maiores que para DENV-2 Br, embora não diferentes estatisticamente (Figura 16). Interessante notar que, comparativamente, as taxas de infecção de DENV-2 Pe na cepa Paea foram mais elevadas que na amostra de Punchana, e que o contrário se observou quando as fêmeas destas duas amostras de mosquitos foram expostas ao vírus DENV-2 Br, independentemente do período de incubação do vírus (14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> d.p.i.)

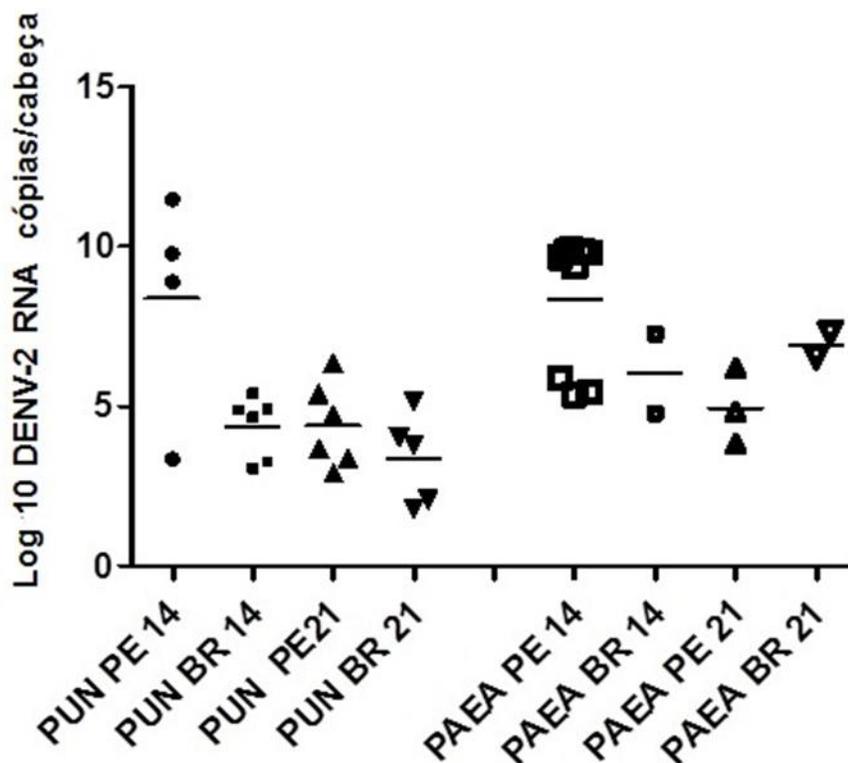
**Tabela 16.** Taxa de disseminação (porcentagem de mosquitos com RNA viral na cabeça a través de RT-PCR) em *Ae. aegypti* de Punchana e da cepa Paea (controle de infecção), oralmente expostas a dois isolados virais originários do Peru e do Brasil, no 14° e 21 d.p.i

Cepa vírus	Localidade	d.p.i.	Taxas de disseminação (n)
DENV-2 HAI 212 Peru	PUN	14	16,7 (30)
		21	20,0 (30)
	PAEA	14	40,0 (10)
		21	30,0 (10)
DENV-2 935/1274 Brasil	PUN	14	35,5 (31)
		21	36,7 (30)
	PAEA	14	28,6 (7)
		21	20,0 (10)



**Figura 16.** Taxa de disseminação (porcentagem de mosquitos com vírus detectados em amostras de cabeça) em mosquitos *Ae. aegypti* da população peruana de Punchana e da cepa Paea, oralmente expostos a DENV-2 isolados do Peru (DENV-2 Pe) e do Brasil (DENV-2 Br), aos 14° e 21° d.p.i. As barras representam a média dos experimentos independentes (Punchana n = 30 cabeças de mosquito, Paea = 10 cabeças de mosquito). As letras a, b, c e d não apresentam diferença significativa segundo teste exato de Fisher,  $p > 0,05$ .

Quando quantificamos número de cópias de RNA na cabeça dos mosquitos em que houve disseminação dos vírus DENV-2 Pe e DENV-2 Br, observamos que, embora o DENV-2 Pe tenha atingido títulos bastante elevados em alguns mosquitos examinados ao 14º d.p.i, seja naqueles procedentes de Punchana seja nos da cepa Paea, não houve diferença significativa entre nenhuma das comparações feitas, seja entre títulos virais detectados dentre populações de mosquitos e isolados virais ou tempo de incubação pós-infecção oral (teste Kruskal Wallis,  $p= 0,2180$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Quantificação da carga viral de DENV-2 Pe e DENV-2 Br em números de cópias de RNA na cabeça de mosquitos *Ae. aegypti* da população peruana de Punchana e da cepa Paea, N=quantidade de amostras analisadas, correspondendo ao número de indivíduos em que houve disseminação viral, ao 14º e 21º d.p.i.

#### **4.4. Testes de avaliação de susceptibilidade a inseticidas em *Ae. aegypti* peruanos.**

Os resultados dos bioensaios reunidos na Tabela 17 indicam que a população de La Curva, da região da costa peruana, é altamente resistente ao inseticida alfacipermetrina, exibindo uma taxa de mortalidade média de 41,3%, variando entre 8,0% e 58,3% nos ensaios. Além disso, a mesma população mostrou estar em estado de possível resistência para deltametrina, com taxa de mortalidade média de 83,4% (30,8-100,0%), comparadas a 100% observada na cepa controle susceptível (Rockefeller). A população Buenos Aires, também da região da costa, apresentou uma ligeira perda de susceptibilidade para o inseticida deltametrina (89,0 a 100%), mas mostrou-se sensível à alfacipermetrina, ao passo que as populações Puerto Maldonado setores 7 e 9, da região amazônica, também apresentaram possível resistência para os piretroides avaliados (níveis entre 91,8 a 97,2). Todas as populações avaliadas foram susceptíveis diante do inseticida malation, com taxas de mortalidade >98,2%, semelhante à observada para cepa controle susceptível Rockefeller (>99,3 %) (Tabela 17).

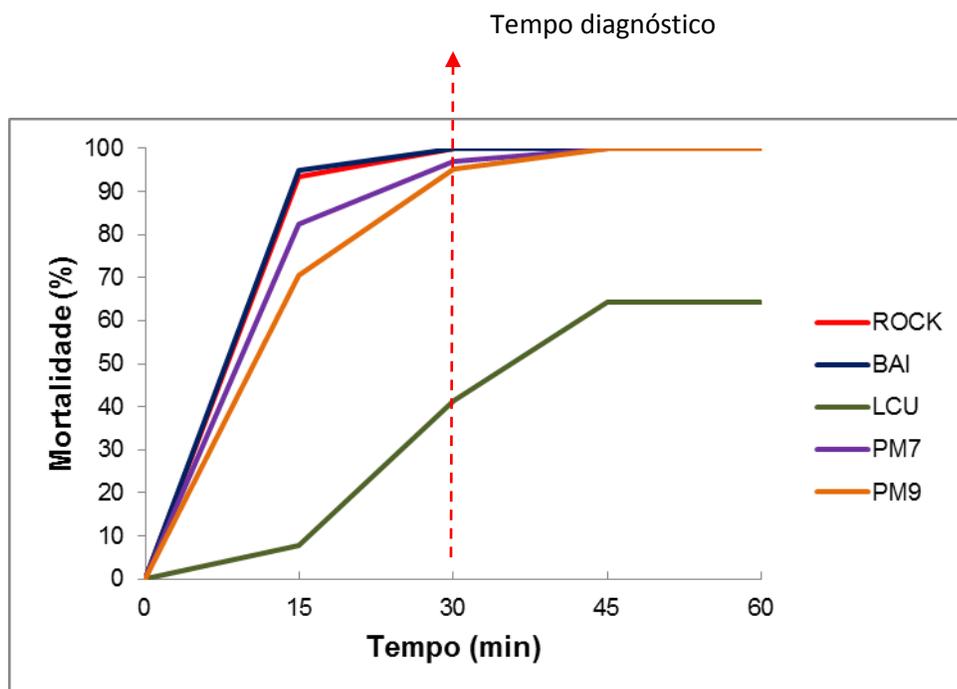
**Tabela 17.** Taxa de mortalidade de segunda geração (F2) de populações de *Ae. aegypti* de diferentes localidades das regiões da costa e amazônia de Peru, coletadas entre novembro e dezembro de 2011, registradas após exposição durante 30 minutos (tempo diagnóstico) a garrafas impregnadas com inseticidas piretroides e organofosforados

Região	Departamento	Localidade	Piretroides						Organofosforado		
			Alfacipermetrina 10 µg/bot°			Deltametrina 10 µg/bot*			Malation 50 µg/bot*		
			N	Mortalidade %	Estado de Resistência	N	Mortalidade %	Estado de Resistência	N	Mortalidade %	Estado de Resistência
Costa	Tumbes	Buenos Aires	300	100,0	S	307	97,7	VR	290	100,0	S
		La Curva	300	41,3	R	301	83,4	VR	296	100,0	S
Amazônia	Madre de Dios	Puerto Maldonado Setor 9	312	95,2	VR	298	93,3	VR	285	99,6	S
		Puerto Maldonado Setor 7	297	97,2	VR	316	91,8	VR	298	98,3	S
	Controle	Cepa Rockefeller	297	100,0	S	296	100,0	S	298	99,3	S

N=número de indivíduos testados; VR=verificação requerida; R=resistência; S=suscetibilidade; °dose diagnóstica segundo INS/Peru; \*dose diagnóstica segundo CDC (Brogdon & Chan (2013). Segundo a OMS: Mortalidade de 98% a 100% = suscetibilidade; de 80% a 97% = verificação requerida; <80% = sugere resistência.

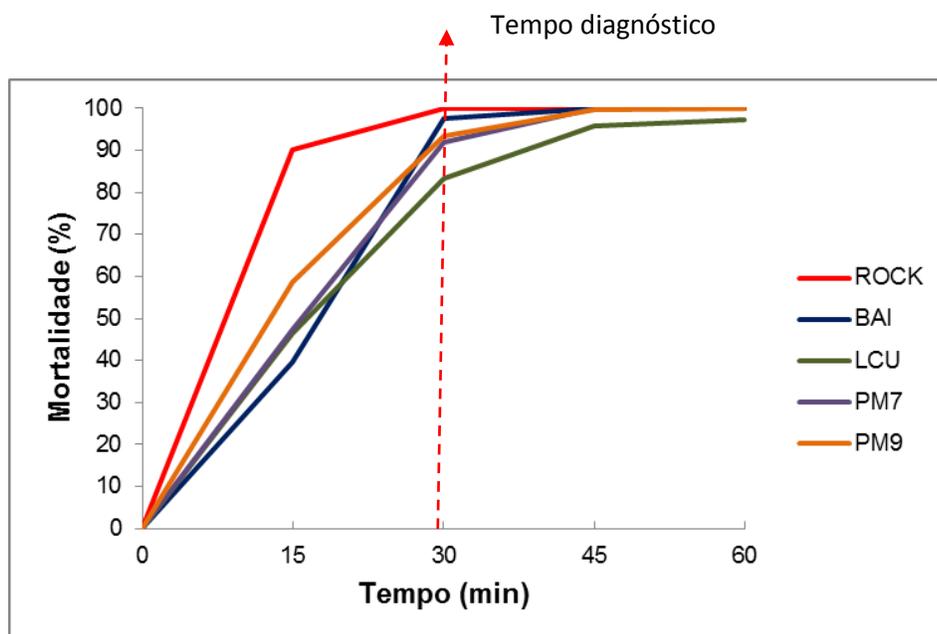
As figuras que se seguem mostram as taxas de mortalidade observada segundo os inseticidas testados e proporcionam informação sobre a distribuição dos fenótipos de tendência à resistência e à susceptibilidade nas populações peruanas de mosquitos testadas segundo o tempo de exposição ao produto químico.

Para alfacipermetrina, a população de La Curva, que apresentou uma mortalidade média de 41,3% no tempo diagnóstico (30 min), ainda mostrou considerável resistência aos 45 e 60 min, destacando-se das demais populações peruanas e do controle (Figura 18). Em relação, as populações Puerto Maldonado setor 7 e Puerto Maldonado 9, observou-se que a maioria dos indivíduos foram susceptíveis e alguns poucos mostraram tendência à resistência. Já a população Buenos Aires apresentou fenótipo completamente susceptível, semelhante à cepa controle Rockefeller. O resultado não mudou em 24 horas de observação (Figura 18).



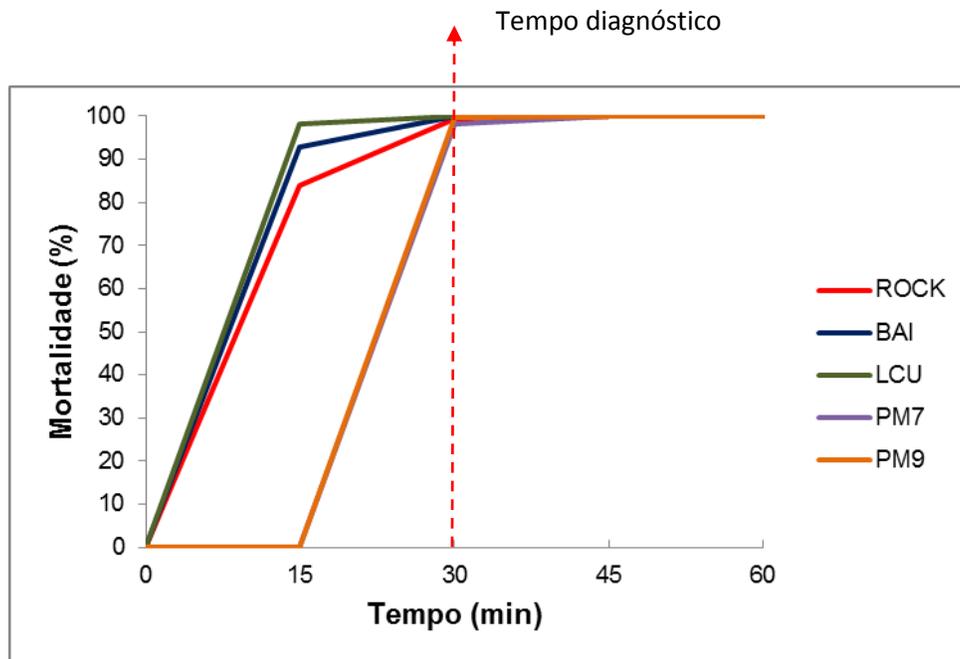
**Figura 18.** Percentual de mortalidade de populações peruanas de *Ae. aegypti* com dose diagnóstica (10 µg/bot) e tempo até 60 minutos para alfacipermetrina. BAI: Buenos Aires, LCU: La Curva, PM7: Puerto Maldonado 7, PM9: Puerto Maldonado 9, e cepa controle de susceptibilidade Rockefeller (ROCK)

Quando consideradas as observações frente à deltametrina, as curvas resultantes dos testes com as populações La Curva, Puerto Maldonado setor 7 e Puerto Maldonado setor 9 apresentaram uma inclinação à direita, diferentemente da população Buenos Aires, em que 97,7% dos indivíduos morreram perto do limiar. O resultado não mudou em 24 horas de observação. (Figura 19).



**Figura 19.** Percentual de mortalidade de populações peruanas de *Ae. aegypti* com dose diagnóstica (10 µg/bot) e tempo até 60 minutos para deltametrina. BAI: Buenos Aires, LCU: La Curva, PM7: Puerto Maldonado 7, PM9: Puerto Maldonado 9, e cepa controle de susceptibilidade Rockefeller (ROCK).

Para as populações Buenos Aires, La Curva e a cepa Rockefeller, as curvas correspondentes ao malation apresentaram mortalidades >98,3% antes do tempo diagnóstico e inclinação da curva para a esquerda, o que evidencia que uma grande proporção de indivíduos são susceptíveis. Em relação às populações Puerto Maldonado setores 9 e 7, observou-se que nenhum indivíduo morreu aos 15 min, mas a maioria deles morreu no tempo diagnóstico (Figura 20).



**Figura 20.** Percentual de mortalidade de populações peruanas de *Ae. aegypti* com dose diagnóstica (50 µg/bot) e tempo até 60 minutos para malation. BAI: Buenos Aires, LCU: La Curva, PM7: Puerto Maldonado 7, PM9: Puerto Maldonado 9, e cepa controle de susceptibilidade Rockefeller (ROCK)

## 5. Discussão

Este estudo representa a primeira investigação comparativa, quantitativa e multicêntrica de aspectos da capacidade vetorial de populações peruanas de *Ae. aegypti* quanto ao vírus dengue, incluindo avaliações simultâneas da densidade, da competência vetorial e do perfil de resistência a inseticidas em populações naturais desse vetor das três regiões naturais no Peru.

### 5.1. Densidade de *Ae. aegypti* nas diferentes regiões climáticas e fitogeográficas do Peru com distintos históricos epidemiológicos de dengue

Nossos resultados de avaliação das frequências de *Ae. aegypti* de 12 localidades que abrangem as três regiões fitogeográficas do Peru (Amazônia, selva alta e costa) foram realizadas em dois momentos, na primavera de 2011 e no outono de 2012. Foram coletados mais ovos na região Amazônia (52%) que nas duas outras regiões amostradas. Assim, as localidades das regiões da costa e selva alta apresentaram números menores de ovos nas coletas, mas estes valores são ainda elevados. Usamos basicamente três indicadores para comparar a frequência do vetor no Peru: a proporção de armadilhas positivas para ovos, o número médio de ovos por armadilha instalada e o número médio de ovos por armadilha positiva. Os índices totais de positividade das ovitrampas variaram de 22,2% a 65,4% entre as 12 localidades amostradas. O maior deles foi detectado na Amazônia, especificamente na localidade de Punchana, onde também se observou a maior média de ovos coletados por armadilha. Em contraste, o menor índice de positividade de ovitrampas foi observado na localidade da costa norte La Curva. Porém foi ali onde se verificou o maior número médio de ovos por armadilha positiva (68,8), comparável ao coletado em Punchana (66,5). Por outro

lado, considerando-se o número médio de ovos por armadilha instalada por localidade foi baixo em La Curva (23,4) teve um número baixo comparado com Punchana (41,2), à giza de exemplo. Estes resultados sugerem não somente grande heterogeneidade quanto à frequência e densidade do vetor no Peru segundo as regiões, mas também, indiretamente, que os mosquitos parecem menos disseminados espacialmente nas localidades amazônicas peruanas que na costa norte e selva alta, onde provavelmente, devido às condições climáticas, o vetor se mantenha em maior densidade em pontos focais. Igualmente, nossos dados estão de acordo com os obtidos por (Villaseca et al. 2001), que realizaram coletas de ovos de *Ae. aegypti* em três localidades (departamentos San Martín, Junin, Tumbes) das três regiões naturais do Peru, durante os meses de setembro e outubro de 2001, utilizando armadilhas de vidro escuro com paleta de papelão. Os autores verificaram que o número de ovitrampas e ovos obtidos foi heterogêneo, ressaltando a maior quantidade de ovitrampas positivas e de ovos por ovitrampas na localidade da Amazônia. Diferente de nossos resultados, obtiveram 100% de positividade das ovitrampas com solução de feno nas três localidades.

A alta densidade de *Ae. aegypti* que encontramos nas três regiões, com destaque para a Amazônia, empregando ovitrampas como método de amostragem, é conflitante com os resultados dos levantamentos de índices de infestação predial obtidos durante as ações de vigilância e controle. Sabe-se que ovitrampas são mais sensíveis para detectar e quantificar o vetor, ainda que não na fase adulta, responsável pela transmissão (Lourenço-de-Oliveira et al. 2008). Igualmente, a metodologia de vigilância com base na pesquisa larvária, a rotina de destruição de criadouros e a utilização de larvicidas, não parecem estar produzindo o impacto desejado nos indicadores epidemiológicos de dengue nas áreas. Assim, esforços de controle adicionais devem ser feitos, porém baseados em dados fornecidos pela vigilância entomológica mais eficiente e que empregue metodologias mais sensíveis, de modo que se faça a definição de áreas prioritárias para a implementação de atividades de controle de vetores, principalmente em áreas onde a densidade seja muito focal, como sugere ocorrer

na costa norte e selva alta. Ferramentas de vigilância capazes de fornecer dados entomológicos precisos tem potencialmente maior poder para determinar o risco de transmissão da doença com base na presença de *Ae. aegypti* (de Melo et al. 2012).

#### **5.1.1. Ovitrapas com dois tipos de suporte**

Nossos resultados quanto à eficiência da coleta de ovos comparando dois tipos de suporte - paleta de madeira e papel-toalha – aplicados às ovitrampas mostraram não haver vantagem para a coleta com paleta de madeira frente ao uso do papel-toalha. Interessante notar que houve diferenças significativas entre as coletas com madeira e papel-toalha em duas localidades da selva alta - Santa Leonor, onde houve maior número ovos em madeira, e Bagua Grande, onde só se coletaram ovos no papel. Em poucos casos, como em Puerto Maldonado, detectou-se diferença entre a positividade de ovitrampas com diferentes suportes entre as coletas realizadas nas duas estações (primavera e outono). Tais diferenças parecem ser ocasionais e depender de fatores locais e de momentos de coleta, como verificado por Kloter et al. (1983), que compararam paletas de fibra prensada (tipo Eucatex) e papel-veludo em ovitrampas instaladas em Nova Orleans.

Muitos suportes para desova tem sido usados e testados em ovitrampas para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, conforme resumido por Service (1993). Por exemplo, Jakob et al. (1970), avaliaram mais de 50 tipos diferentes de substratos para desova em ovitrampas para coleta de *Ae. aegypti*, inclusive testando diferentes cores para um mesmo substrato. Os suportes normalmente mais usados são paletas de fibra prensada, mas já foram experimentados e comparados outros suportes para oviposição, como abaixadores de língua em madeira, pano e uma variedade de papéis, como papel-veludo, papel-pardo e papel-absorvente (Fay & Eliason 1966; Toma et al. 1982; Kloter et al. 1983; Service 1992). Wong et al. (2011), realizaram um inquérito em Iquitos, Peru, que objetivava estudar o comportamento de oviposição de *Ae. aegypti*, incluindo avaliação do tipo de material de fabricação dos criadouros naturalmente existentes na cidade (se de

plástico, metal ou cimento), notando diferença entre o número de ovos coletados, com nítida vantagem para os depósitos feitos de cimento. Porém, quando esses autores forraram a borda interna de recipientes fabricados com estes diferentes materiais com papel-toalha, observaram aumento significativo das coletas em recipiente de plástico e metal, o que não foi visto quando o recipiente era de cimento, material rugoso. Semelhante ao que encontramos, Jakob et al. (1970) e Kloter et al. (1983), embora trabalhando com suportes ligeiramente diferentes dos que usamos (versus paleta de madeira), não verificaram diferença entre a atratividade dos suportes (pepel-veludo versus paleta de fibra prensada). Desse modo, considerando a maior disponibilidade, a maior facilidade para aquisição e o menor custo, o uso do papel pode ser mais convenientes. É importante ressaltar que os papéis recolhidos com ovos necessitam ser transportados e conservados em câmaras úmidas mais precocemente que as paletas de madeira ou Eucatex, pois tendem a secar mais rapidamente, o que pode prejudicar, não a contagem dos ovos, mas a viabilidade dos mesmos.

## **5.2. Competência vetorial de populações peruanas de *Ae. aegypti* para DENV-2 do Peru.**

Nossos experimentos de avaliação da susceptibilidade oral de seis populações de *Ae. aegypti* representantes de três regiões fitogeográficas distintas do Peru foram realizados com a cepa de DENV-2 - HAI 212, genótipo Americano de origem asiática- obtida de paciente durante uma epidemia de dengue ocorrida em 2011, em Iquitos, no departamento de Loreto. Assim, a amostra viral usada foi isolada recentemente, coincidindo com o início das coletas dos mosquitos destinados aos experimentos. Podemos dizer, portanto, que os mosquitos e vírus testados são essencialmente contemporâneos e simpátricos para pelo menos uma das localidades, Punchana, do departamento de Loreto. Os mosquitos se achavam na segunda geração e vírus na quarta passagem, quando o título era de  $10^{7,76}$ TCID<sub>50</sub>/1,0mL. Embora as populações de *Ae. aegypti* tenham sido

alimentadas com o repasto infectante em diferentes dias, todas ingeriram uma mistura de sangue e suspensões da mesma massa viral e com título ajustado e igual. Esse título era semelhante ao empregado em estudos análogos realizados por vários autores, como por exemplo Bosio et al. (1998) ( $10^{7,58}$ TCID<sub>50</sub>/1,0mL), porém menor que os usados, por Vazeille et al. (2003) ( $10^{8,2}$ MID<sub>50</sub>/mL e  $10^{8,1}$ MID<sub>50</sub>/mL), Lourenco-de-Oliveira et al. (2004) ( $10^{8,2}$ MID<sub>50</sub>/1,0mL) e Richardson et al. (2006) ( $10^{9,95}$ TCID<sub>50</sub>/1,0mL) em células C636. A potencial influência do título e o genótipo do vírus usado no sucesso da infecção oral experimental de mosquitos, especialmente na taxa de disseminação viral e de transmissão pela picada, é um tema que merece destaque e discussão.

Os ensaios de Bosio et al. (1998) demonstraram que o título do vírus na alimentação sanguínea não foi correlacionado com a proporção de mosquitos em que se desenvolveram infecções no intestino ou disseminação. Seus resultados sugerem que as barreiras à infecção e disseminação determinadas geneticamente, independentemente do título do vírus ingerido, que determinariam a competência do vetor para o vírus DEN-2. Porém, os mesmos autores, Bosio et al. (2000) concluíram, mais tarde, que tanto a dose infecciosa quanto as barreiras (determinadas por *quantitative trait loci* [QTL]) podem determinar se os mosquitos *Ae. aegypti* serão infectados quando se alimentarem em um ser humano infectado pelo dengue. Gubler et al. (1979) também encontraram uma relação direta entre a quantidade de vírus ingeridos e a taxa de infecção em uma determinada cepa de mosquito. Além disso, Lambrechts et al. (2012) e Nguyen et al. (2013) demonstraram que quanto mais elevada o título viral no repasto infectante do mosquito, maior a probabilidade de haver disseminação do vírus para os tecidos secundários, como patas e asas. Além disso, quanto maior a carga viral naqueles tecidos, maior a chance de se encontrar vírus na saliva. Seja como for, a maioria dos estudos de infecção experimentais de mosquitos tem usado títulos virais no repasto semelhantes ou ligeiramente mais elevados que aqueles detectados em humanos virêmicos, que exibiriam títulos que podem variar de  $10^2$  a  $10^7$  PFU/mL ou  $10^3$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml (revisado em (Salazar et al. 2007). Ainda assim, diferenças importantes tem-sido observadas nas taxas de disseminação viral no vetor.

Assim, além do título viral, outro fator relativo ao repasto infectante do mosquito que parece influenciar as taxas de infecção e disseminação é a origem do vírus oferecido. Ou melhor, diferentes genótipos, linhagens ou cepas virais do mesmo sorotipo viral de DENV podem ter melhor desempenho na infecção e disseminação no vetor. Vazeille et al. (2013), observaram taxas de disseminação de 46,1% para DENV-2 e 80% para DENV-3 em *Ae. aegypti formosus*. No que diz respeito a genótipos de um mesmo sorotipo, Salazar et al. (2010), demonstraram a influência do genótipo de DENV-2 testado - Americano e America/Asia - na infecção em *Ae. aegypti* da península de Yucatan, México (cepa Chetumal). Eles observaram que os vírus de ambos os genótipos foram equivalentes na sua capacidade de infectar o intestino médio do mosquito. No entanto, os vírus do genótipo America/Asia foram mais eficientes na disseminação e infecção das glândulas salivares. Segundo os autores, mudanças em aminoácidos na proteína E e em nucleotídeos na 3'UTR podem estar relacionadas com este fenótipo. Lambrechts et al. (2012), mostraram que diferentes amostras de distintas linhagens de um mesmo genótipo de DENV-1 tinham diversas capacidades de disseminar em populações de *Ae. aegypti* da Tailândia. Enfim, algumas cepas virais têm sido seguidamente usadas por alguns autores em experimentos de infecção de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em vista de sua distinta capacidade em infectar mosquitos (Vazeille-Falcoz et al. 1999; Fouque et al. 2001; Lourenco de Oliveira et al. 2003; Vazeille et al. 2003; Lourenco-de-Oliveira et al. 2004). Desconhecem-se ainda as razões pelas quais essas cepas infectam melhor mosquitos, digamos, “adaptadas” em laboratório, que outras, recentemente isoladas.

Com efeito, em nossas avaliações, empregamos a quarta passagem de um isolado recente de DENV-2 do Peru e não uma cepa mantida em laboratório e cuja capacidade de infectar a maioria dos mosquitos já era reconhecida. Os nossos resultados revelaram que as taxas de disseminação viral nos *Ae. aegypti* peruanos são heterogêneas e variaram de 6,7% a 53,3%. As taxas correspondentes para a cepa controle Paea também variaram com percentuais semelhantes: 10,0% a 40,0%. As taxas de disseminação que observamos para a cepa controle Paea são

bastante inferiores àquelas observadas por outros autores (Vazeille-Falcoz et al. 1999; Lourenco de Oliveira et al. 2003; Vazeille et al. 2003; Lourenco-de-Oliveira et al. 2004), que geralmente obtiveram 85-100% de encontro de DENV-2 na cabeça de mosquitos infectados e incubados com temperatura semelhante a que usamos, por 14 dias. Essa diferença deve-se, seguramente, à cepa viral usada: enquanto usamos uma cepa recentemente isolada do genótipo América/Ásia, os citados autores usaram uma cepa adaptada e do genótipo Asiático. Armstrong & Rico-Hesse (2003) observaram que o genótipo Americano de DENV-2 exibe taxas de disseminação consideravelmente mais baixa que o genótipo do Sudeste Asiático.

Independentemente dessa diferença, verificamos que todas as seis populações peruanas de *Ae. aegypti* testadas são competentes para transmitir o DENV-2. Assim, se a presença do vírus é frequente nos tecidos nervosos da cabeça daqueles mosquitos em que houve disseminação viral (Salazar et al. 2007) e se há uma relação positiva entre a presença de DENV nos tecidos secundários e a presença de partículas virais infectantes na saliva dos indivíduos (Lambrechts et al. 2012; Nguyen et al. 2013), poder-se-ia sugerir que considerável proporção dos mosquitos peruanos testados é competente para transmitir o vírus na picada. Além disso, a heterogeneidade na taxa de disseminação do DENV-2 peruanos pode refletir a variabilidade fitogeográfica da origem das populações de *Ae. aegypti* testadas, que por sua vez possivelmente influencia a variabilidade genética das mesmas. Heterogeneidade na taxa de disseminação de DENV-2 também foi observada entre populações de *Ae. aegypti* coletadas em distintas regiões do Brasil (Lourenco-de-Oliveira et al. 2004). Por outro lado, houve homogeneidade nas taxas de disseminação de DENV-2 em populações urbanas e suburbanas da Guiana Francesa (Fouque et al. 2001). Estes dados contrastantes devem-se provavelmente às distâncias geográficas de diferenciação genética das populações testadas dos mosquitos em cada país. A competência vetorial é influenciada por fatores ambientais (Lambrechts et al. 2011). Considerando-se o exemplo sulamericano, a heterogeneidade na taxa de disseminação viral observada por nós, no Peru, e por Lourenco-de-Oliveira et al. (2004), no Brasil,

onde há grande heterogeneidade de ecossistemas, contrasta fortemente com a homogeneidade obtida para a Guiana Francesa, com os ecossistemas menos variáveis (Fouque et al. 2001).

A menor taxa de disseminação observada para populações peruanas de *Ae. aegypti* foi em mosquitos de La Curva (6,7%), localidade da costa norte e de clima árido, ao passo que as maiores foram as detectadas para as duas populações da selva alta e clima chuvoso, quente e úmido, ou seja, Rio Negro (53%) e Bagua Grande (30,0%), diferença significativa estatisticamente. Por outro lado, as taxas de disseminação detectadas entre populações da mesma região fitogeográfica foram consideradas semelhantes, excetuando-se apenas o caso da costa, onde a baixa taxa exibida pela população de mosquitos de La Curva distinguiu-se daquela de Sanchez Cerro. A variabilidade genética de populações peruanas de *Ae. aegypti* pode ajudar a elucidar alguns desses achados.

As taxas de infecção, disseminação e transmissão por vírus dengue são variáveis quantitativas, que parecem estar distribuídas continua e distintamente entre os indivíduos de uma população de mosquitos e está sujeita a fatores ambientais. Recentes avanços da biologia molecular e genética quantitativa permitiram o mapeamento de *loci* que afetam a expressão de caracteres quantitativos, denominados QTL que afetariam a capacidade de *Ae. aegypti* se tornar infectado e transmitir o DENV. Bosio et al. (2000) realizaram um dos estudos pioneiros de mapeamento e caracterização de genes que controlam a infecção viral do intestino médio e as barreiras de escape do vírus no mosquito. Antes, porém, Bosio et al. (1998) realizaram o mapeamento genético de genes relacionados com o controle da barreira de escape do intestino médio em 36 mosquitos com intestino médio infectado, dos quais 29 tinham o vírus disseminado para a cabeça e sete pareciam ter uma barreira de escape no intestino, pois não exibiu disseminação. Os seus resultados sugeriram que a transmissão da DENV é uma característica genética sob o controle de pelo menos três loci e foram consistentes com a hipótese de que a variação nas taxas de infecção de dengue entre populações naturais de *Ae. aegypti* é devida à segregação de alelos em

cada um dos três QTL. Além disso, variações naturais na competência do vetor frente aos DENVs podem ser, em parte, devidas às diferenças nos mecanismos de defesa em mosquitos, especialmente na regulação, indução e transcrição de moléculas e vias envolvidas na resposta imune (Toll e JAK-STAT, e RNA de interferência [RNAi]), que também são controlados geneticamente (Carvalho-Leandro et al. 2012).

Estudos relativos à variabilidade genética das populações naturais de *Ae. aegypti* de algumas áreas no Peru realizados por (Leiva & Cáceres 2004) sugeriram o seu agrupamento em duas grandes variantes genéticas, uma costeira (departamentos de Tumbes, Piura e Lima) e outra existente ao leste dos Andes (departamentos de Loreto, Cajamarca, Lambayeque e Huanuco), não havendo, porém, correlação positiva entre as distâncias genéticas das populações de *Ae. aegypti* estudadas e as distâncias geográficas da sua origem. Já da Costa-da-Silva et al. (2005), verificaram que a população da costa noroeste seca, Piura, era diferenciada tanto daquela do nordeste Amazônico, Loreto, quanto da costa central também seca, Lima, estas duas últimas exibindo menor variabilidade genética e semelhantes entre si quanto ao haplótipo detectado para o gene ND4 mitocondrial. Comparando sequências do mesmo gene, Yáñez et al. (2013), cinco haplótipos, dos quais a distribuição geográfica de três deles se restringe à costa, e os dois outros ocorrem, respectivamente, no sudeste Amazônico e no nordeste Amazônico e selva alta. Uma variabilidade maior na costa noroeste pode explicar a diferença nas taxas encontradas entre as duas populações (LCU e SCE) desta região por nós testadas.

A disseminação de arbovírus em uma população de vetores é determinada por barreiras no mosquito vetor (Tardieux et al. 1990). Os DENVs enfrentam uma série de "barreiras" que incluem a MIB e processos de MEB, além dos eventos reativos e envolvidos na imunidade, na digestão, na replicação viral e em todos os mecanismos que influenciam cada um destes (Tabachnick 2013). Assim, indivíduos de uma mesma população podem limitar a disseminação e/ou a transmissão do vírus, tornando o mosquito incompetente para a transmissão

(Hardy et al. 1983; Kramer & Ebel 2003). Gubler & Rosen (1976) foram os primeiros ao descrever uma “barreira intestinal” (MIB) para a disseminação do vírus após a sua replicação no epitélio do estômago (ou intestino médio) do mosquito. Diferenças não significativas se observaram em varias cepas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* que foram inoculadas por via parenteral de modo que quando a barreira MIB foi superada o crescimento do vírus nos tecidos foi o mesmo em todas as populações, incluindo as glândulas salivares de mosquitos susceptíveis e resistentes. Além disso, os mosquitos de populações resistentes seriam tão capazes de transmitir o vírus quanto os de populações sensíveis, uma vez que o vírus esteja disseminado (Gubler et al. 1979). Contudo, alguns autores aludem a existência de barreiras na glândula salivar (*Salivary Gland Infection Barrier* e *Salivary Gland Escape Barrier*) (Halstead 2008; Vazeille et al. 2013), o que sugeriria que nem todos os mosquitos onde o vírus disseminou do estômago transmitiria o vírus.

Salazar et al. (2007) estudaram o tropismo viral de DENV quando a infecção é disseminada (corpo gorduroso abdominal e torácico, glândulas salivares, células nervosas e outros tecidos). Nas glândulas salivares, foi observado, um maior tropismo de DENV-2 para os lóbulos laterais em relação aos lóbulos medial e proximal. Sabe-se que os lóbulos laterais distais participam de forma proeminente na secreção de enzimas e de proteínas envolvidas na hematofagia (Smartt et al. 1995). Antígeno viral foi detectado frequentemente no corpo gorduroso abdominal e torácico, sugerindo que este tecido é um sítio importante de replicação de DENV-2 depois de disseminado. Curiosamente, o corpo gorduroso, também desempenha um papel importante na resposta imune do inseto contra patógenos. É importante frisar que grande concentração viral foi também detectada, inclusive precocemente, por Salazar et al. (2007) em tecidos nervosos da cabeça, tecidos que usamos no diagnóstico no presente estudo.

Ainda se desconhece qual a quantidade de partículas virais infectantes na saliva de um mosquito que seria capaz de infectar humanos, mas, por outro lado, é possível que a carga viral inoculada possa exercer influência no curso da

infecção e da doença. A determinação da carga viral na cabeça ou saliva de mosquitos infectados com arbovírus tem sido frequentemente feita através da inoculação de homogenatos em cultura de células em placas, onde as titulações são obtidas por diluições sucessivas (Schoepp & Beaty 1984; Amraoui et al. 2012; Vega-Rua et al. 2013). Este método permite a determinação da quantidade de partículas virais infectantes, embora seja mais laborioso, demorado e possa resultar em contaminação das culturas, especialmente quando incubadas longamente, como é o caso de DENV (incubação de 5 dias). Mas, os avanços na biologia molecular têm oferecido novas abordagens para se avaliarem aspectos quantitativos da competência vetorial, como é o caso particular do teste RT-PCR quantitativo em Tempo Real pelo sistema TAqMAN<sup>TM</sup> (qRT-PCR), que permite a quantificação de cópias de RNA viral com alta sensibilidade, especificidade e velocidade, além de ter poder estatístico que facilita análises precisas. A ferramenta molecular do qRT-PCR tem sido padronizada para estudar as interações vírus-vetor por vários autores (Richardson et al. 2006; Zhang et al. 2010; Carvalho-Leandro et al. 2012). Por conta disso, usamos este método na quantificação viral na cabeça dos mosquitos em que houve diagnóstico de disseminação viral. A quantificação de cópias do RNA viral foi feita a partir de uma amostra de apenas 5 µL, dos 250 µL do homogenato das cabeças de cada mosquito ao 14º d.p.i., e o valor da leitura dos 5 µL foi multiplicado por 50 e transformado em logaritmo de 10 para facilitar as comparações em tabelas e gráficos, assim como para se potencialmente inferir acerca do número de partículas virais infecciosas.

Quanto a esse último aspecto, alguns autores têm verificado haver correlações positivas entre o número de cópias de RNA de DENV-2 (+) e números de PFU em células C6/36 e em corpo de *Ae. aegypti* inoculados. Com efeito, há uma diferença entre o número de cópias de RNA viral e o de PFU devida a existência de partículas virais defeituosas, partículas virais “imaturas” ou inativadas, ou RNA viral livre a partir de células infectadas no material examinado. Portanto, o número de cópias de RNA viral está superestimado em ~2-3 vezes

(em log) com relação ao número de PFU por (Richardson et al. 2006; Salazar et al. 2007).

Observamos uma alta variação nos níveis máximos e mínimos dos títulos de cópias de RNA nas cabeças de mosquitos dentro e entre populações avaliadas. Contudo, ainda que não tenha havido diferença significativa entre os valores obtidos, podemos agrupar as seis populações peruanas em dois conjuntos de acordo com a mediana do número de cópias de RNA: aquelas cujas medianas dos indivíduos apresentavam valores em torno de log 10 (PUN e PM7, da Amazônia, e BGR, da selva alta) e em torno de log 5 (RNE, da selva alta, e LCU e SCE, da costa). Alguns indivíduos de PUN chegaram a ter  $5,0 \times 10^9$  cópias de RNA viral na cabeça, o que corresponderia a mais de  $10^7$  PFU/ cabeça, uma quantidade bastante elevada de partículas infecciosas. Nos exemplares da região de selva alta, RNE e BGR, onde houve as maiores taxas de disseminação viral (53% e 30%, respectivamente), ou mesmo naqueles de SCE (costa), identificaram-se indivíduos com o que corresponderia a títulos tão elevados quanto  $1 \times 10^6$  PFU/ cabeça. Merece nota o fato de que o número de indivíduos em que foi feita a titulação viral nos tecidos da cabeça variou consideravelmente, pois dependeu do número de indivíduos positivos para a disseminação viral. Assim, o resultado de titulação viral de populações como LCU (N=2), deve ser considerado com cautela.

Seja como for, esses valores de carga elevados de viral sugerem fortemente a presença de vírus na saliva dos indivíduos infectados. Este resultado somado àqueles das taxas de disseminação viral, reforçam nossa proposição de que as populações peruanas testadas são consideravelmente competentes para transmitir o DENV-2, embora de modo heterogêneo.

Cabe lembrar que a competência vetorial, ou receptividade e capacidade de transmitir o vírus, é um dos aspectos a serem levados em consideração para a determinação da capacidade vetorial, na qual outros fatores, especialmente ecológicos e climáticos, exercem grande influência, como discutiremos mais tarde.

### **5.3. Competência vetorial comparativa de uma população peruana de *Ae. aegypti* frente a amostras de DENV2 que circulam no Peru e no Brasil.**

Estudos recentes têm fornecido evidências de interações importantes entre o genótipo vírus da dengue e o genótipo, ou características genéticas intrínsecas, individuais do *Ae. aegypti*, dita interação genótipo viral - genótipo do mosquito, ou genótipo à genótipo, ou GxG. Assim, Lambrechts et al. (2009), realizaram um comparativo com três grupos de fêmeas da geração F3 de *Ae. aegypti* filhas de uma mesma mãe (isofêmeas), todos de uma mesma localidade tailandesa e oriundas de uma mesma coleta, infectando-os com três isolados contemporâneos de DENV-1 tailandês. O método de isolamento e o título viral eram os mesmos, e todos correspondiam à baixa passagem, porém eram de origem geográfica diferente no país. Verificaram que os grupos apresentaram distintos perfis de infecção quando se consideraram os índices ou taxas normalmente usados na determinação da competência vetorial. Assim, houve correlação significativa entre (1) a taxa de infecção do intestino médio, (2) a carga viral no corpo do mosquito e (3) a quantidade de vírus disseminada para a cabeça e patas e as combinações entre grupos de isofêmeas e isolados virais. Viram também que a taxa de disseminação, que corresponde ao indicador do sucesso da disseminação do vírus para tecidos secundários, não apresentava esta correlação como os demais indicadores. Esse resultado foi interpretado pelos autores como forte indício de demonstração de interação significativa do tipo GxG. Ou seja, haveria especificidades genéticas nas interações, sendo o sucesso da disseminação controlado por conjuntos de genes distintos daquelas que controlam outros fenótipos, como a carga viral no corpo, na cabeça ou pernas, uma vez que estes últimos foram determinados pela combinação específica de família mosquito e isolado de vírus, e o primeiro não (Lambrechts et al. 2009; Lambrechts 2011). Tais interações genéticas entre os dois organismos distintos podem ser vistos como

epistasia intergenômica (Lambrechts 2010; 2011). Além disso, acredita-se que, em certa medida, a organização espacial dos genótipos e linhagens de DENV pode refletir na distribuição geográfica de genótipos de *Ae. aegypti* (Lambrechts et al. 2009), semelhante ao que foi demonstrado para *Plasmodium vivax* e seus vetores *Anopheles* (Joy et al. 2008).

A fim de tentar detectar a ocorrência de relação de especificidade GxG em população de *Ae. aegypti* do Peru, investigando, assim, a possibilidade de haver co-evolução adaptativa vírus-mosquito em populações naturais deste país, infectamos comparativamente indivíduos de uma mesma população peruana – Punchana- com duas amostras de DENV-2 do mesmo genótipo (América/Ásia): uma amostra simpátrica à população de Punchana (isolada no mesmo ano, 2011) (cepa HAI 212), e uma amostra isolada do Brasil (cepa 935/1274, isolada do mosquito *Ae. aegypti* no ano 2012). Ambas as amostra virais estavam na quarta passagens em cultura de células e continha o mesmo título viral no repasto infectante. Os mosquitos foram examinados com 14 e 21 d.p.i.

Nossos resultados mostram que as taxas de disseminação da infecção na população PUN foi menor para o vírus simpátrico (DENV-2 Pe) que para a amostra alopátrica (DENV-2 Br), tanto ao 14<sup>o</sup> d.p.i. quanto ao 21<sup>o</sup> d.p.i. Comparativamente, no 14<sup>o</sup> d.p.i as taxas de disseminação para o vírus alopátrico foi mais do dobro (35,5%) que a observada com a amostra viral simpátrica (16,7%). Fundamentalmente, verificou-se o mesmo ao 21<sup>o</sup> d.p.i. (20% versus 36,7%). Interessante que as taxas de disseminação para cada amostra viral não variou com o tempo, ou seja, não aumentou significativamente, entre o 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> d.p.i. Também é interessante notar que o oposto ocorreu com as taxas de disseminação da infecção na cepa controle de infecção, Paea, originária da Polinésia Francesa e longamente colonizada em laboratório, e, portanto, nem simpátrica e nem contemporânea a nenhuma das amostras virais. Ou seja, em Paea as taxas foram ligeiramente mais altas para o DENV-2 Pe que para DENV-2 BR, e diminuíram um pouco entre o 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> d.p.i.

Mousson et al. (2002), obtiveram taxas de disseminação muito elevadas em *Ae. aegypti* da Tailândia ao expô-las a uma amostra de DENV-2 também coletada na Tailândia, ainda que não contemporânea aos mosquitos, e atribuíram esses resultados ao fato de que mosquitos e amostra viral eram simpátricas. Armstrong & Rico-Hesse (2003), verificaram que a taxa de disseminação em *Ae. aegypti* de Tehuantepec, México, eram maiores quando expostos a uma cepa de DENV-2 (Oax468) isolada de um paciente em Juchitan, México, que a verificada com mosquitos de McAllen, Texas expostos ao mesmo vírus. O oposto foi detectado, quando usaram uma cepa isolada da fronteira Texas-México (cepa 328298). Com isso, os autores, levantaram a hipótese de que o vírus da dengue pode se tornar localmente adaptado ao seu mosquito vetor, sugerindo que esses resultados evidenciariam vantagem adaptativa local.

Contudo, segundo os dados recentes obtidos por Lambrechts et al. (2009); (Lambrechts 2011), sugerem que a taxa de disseminação viral seria um indicador menos robusto do efeito da interação GxG vírus dengue e mosquito, quando comparados com outros indicadores, como a carga viral disseminada ou a carga viral total no corpo do inseto. Nesse sentido, as taxas de disseminação menores que encontramos na população PUN exposta ao DENV-2 Pe em relação à cepa alopatrica podem não ser evidências de falta de adaptação local ou de desvantagem adaptativa local.

Assim, quando examinamos a carga viral detectada na cabeça dos mosquitos de PUN expostos ao DENV-2 simpátrico, verificamos que a mediana dos títulos individuais foram maiores que para o vírus alopatrico, embora não se tenha observado diferença significativa entre eles. Devemos, contudo, observar estes dados com cautela, pois o número de indivíduos que pudemos testar para cada combinação vírus – mosquito foi pequeno e realizamos apenas um ensaio. Mas, ainda assim, as medianas conseguidas com 14 d.p.i, com a cepa DENV-2 Pe, sugerem haver vantagem adaptativa para esta cepa simpátrica ao *Ae. aegypti* local, embora réplicas precisem ainda serem realizadas.

Nossos resultados relativos à carga viral na cabeça dos mosquitos, mais precisamente de número de cópias de RNA de DENV-2, mostraram valores medianos semelhantes (para a população de PUN) ou mesmo menores (Paea) nas cabeças examinadas a 21° d.p.i., embora não sendo estatisticamente diferentes neste último caso. Esses achados concordam com os resultados obtidos por Salazar et al. (2007). Esses autores fizeram comparações entre a carga viral de DENV-2 em mosquitos, experimentalmente infectados, através de qRT-PCR e de inoculação de diluições sucessivas em cultura de célula aos 7º, 14º e 21º d.p.i. Neste período, número de cópias de RNA viral permaneceu estável (entre 7,2 e 7,6 log 10 cópia/ intestino médio). Em contraste, os títulos de vírus diminuíram (6 e 4 TCID<sub>50</sub>/ intestino médio) com o tempo. Assim, nossos dados, juntamente com os obtidos por Salazar et al. (2007), sugerem, pelo menos, que não há tendência do título viral aumentar com o tempo no corpo do mosquito como um todo.

#### **5.4. Perfis de resistência a inseticidas de populações peruanas de *Ae. aegypti* no Peru versus competência vetorial.**

Os perfis de susceptibilidade e resistência para alfacipermetrina, deltametrina (piretroides) e malation (organofosforado) de *Ae. aegypti*, geração F2, de 4 localidades no Peru à dose diagnóstica foram determinados de acordo com bioensaios comparativos à cepa Rockefeller. Com exceção de uma população da costa (Buenos Aires), as outras três populações testadas mostraram resistência em níveis diferentes para alfacipermetrina e todas as quatro apresentaram níveis de resistência incipiente para deltametrina. Porém, todas as populações avaliadas foram sensíveis para malation. Esses resultados são originais em parte quando considerados os inquéritos anteriormente realizados nestas localidades ou próximos delas.

Alta variabilidade nos níveis de resistência de populações peruanas de *Ae. aegypti* a inseticidas já tinha sido observada em avaliações anteriores feitas pelo

Instituto Nacional de Saúde do Peru (INS), órgão responsável pela vigilância em saúde no país. Assim, o INS detectou resistência de *Ae. aegypti* à permetrina na costa norte, na fronteira com o Equador (localidade Andrés Araujo, em Tumbes), em 2005, e à alfacipermetrina no sudeste Amazônico, na fronteira com o Brasil (Puerto Maldonado, em Madre de Dios), embora esta última tenha sido susceptível à deltametrina (MINSa 2011). Contudo, outra amostra de população amazônica, porém localizada ao nordeste, próximo à fronteira da Colômbia e do Brasil (Iquitos, em Loreto) revelaram-se susceptíveis à alfacipermetrina. Bisset et al. (2007), demonstraram diferentes níveis de resistência para inseticidas em populações de *Ae. aegypti* de duas províncias da costa norte do Peru: Tumbes (departamento Tumbes) e Trujillo (departamento La Libertad). Os resultados mostraram que a população de Trujillo tinha resistência a DDT (organoclorado), ciflutrina e lamdacialotrina (piretroide), mas não à betacipermetrina, deltametrina (piretroides) e clorpirifós (organofosforado). Porém, a população de Tumbes foi resistente ao DDT e a piretroides, mas não a clorpirifós (organofosforado). Também, foi demonstrada resistência para inseticidas temephos e clorpirifós em larvas de *Ae. aegypti* da população de Trujillo, e provas bioquímicas revelaram alta frequência de atividade de esterases, glutathione S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) e prevalência da atividade amplificada de esterase A4. Estas enzimas estão envolvidas com processos de detoxificação dos inseticidas, mecanismos conhecido por resistência metabólica (Bisset et al. 2007).

A alta variabilidade nos níveis de resistência aos inseticidas nas populações de *Ae. aegypti* do Peru devem ser consequência da pressão de seleção exercida por inseticidas usados, em quantidade e frequência diferentes, para o controle da dengue, porém também da malária e de pragas de agricultura. Nesse contexto, as populações da costa norte tem estado sob forte pressão devido à aplicação de inseticidas, especialmente adulticidas para o controle da malária, incluindo DDT (organoclorado), que foi implementado a partir de 1957-1960, e retomado de 1980-1992, período em que *Ae. aegypti* voltou a colonizar o Peru (1984), sendo que a partir de 1993 foi substituído por piretroides (Arata et al. 1999; Bisset et al. 2007). Ou seja, populações de *Ae. aegypti* da costa norte tem

entrado em contato com estes inseticidas há quase 30 anos, embora não usados diretamente ou intencionalmente para o seu controle. Além disso, a partir do final dos anos 1990, iniciou-se um processo de intensa circulação de vírus dengue no país, com epidemias que atingiram principalmente a região da Amazônia, mas também a costa norte do país, o que intensificou o uso de piretroides. Esse histórico de uso de inseticidas na costa norte pode explicar a resistência à alfacipermetrina que detectamos na população de La Curva, departamento de Tumbes, costa norte (apenas 41,3% de mortalidade), ainda que uma população de outra localidade do mesmo departamento (Buenos Aires) tenha-se revelado sensível a este inseticida. O fato é que resistência à permetrina e resistência para confirmar a deltametrina também já tinha sido detectada em Andrés Araujo (Tumbes), em 2005 (Balta & Villaseca 2005).

Com efeito, a dispersão do vetor foi notável entre 1999 e 2011, ampliando sua distribuição para 269 municípios em 18 departamentos (MINSA 2011), onde circulam os quatro sorotipos (DENV 1 - 4) (Arrasco 2011). Seja na costa ou em outras localidades endêmicas ou epidêmicas de dengue, o Ministério de Saúde (MINSA) usa rotineira e ciclicamente larvicidas (temephos) e adulticidas (piretróides), este último somente nas epidemias (MINSA 2011). Durante o curso de epidemia de dengue, amostra de *Ae. aegypti* adultos, gerados diretamente de larvas coletadas durante intensas ações de controle realizadas com aplicação de alfacipermetrina em Puerto Maldonado, em abril de 2011, revelaram-se resistentes a esse adulticida (74,3% de mortalidade) (MINSA 2011), dados que contrastam com os nossos presentes resultados para dois bairros da mesma cidade, porém com testes realizados com geração F2 de ovos coletados setes meses após (novembro-dezembro 2011), que mostraram apenas resistência insipiente à alfacipermetrina (95,2-97,2% de mortalidade). Porém, para abril 2011, houve 98% de mortalidade nos bioensaios com deltametrina, enquanto, para novembro-dezembro 2011 (MINSA 2011), a mortalidade para deltametrina diminuiu para 91,8-93,3%. A tendência à resistência à deltametrina parece estar mais disseminada no Peru segundo as curvas de mortalidade dose/tempo para as amostras das quatro localidades testadas, sejam de Puerto Maldonado, amazônia,

sejam da costa norte, uma vez que revelaram tendência de deslocamento para a direita, afastando-se da curva desenhada com dados da cepa controle, Rockefeller, o que converge com os resultados de Rodriguez et al. (2007).

Infelizmente, não foi possível obter dados do perfil de resistência de todas as mesmas populações de *Ae. aegypti* avaliadas quanto à competência vetorial de modo que se pudesse realizar uma análise robusta quanto à possibilidade de interferência, direta ou indireta, de um fenótipo sobre o outro na situação existente no Peru. Ainda assim, curiosamente, foi observado que a população de La Curva que apresenta fenótipo de resistência para os piretróides, com a mais alta resistência à alfacipermetrina, foi a menos susceptível à infecção por DENV-2 Pe, exibindo a mais baixa taxa de disseminação (6,5%) dentro todas as amostras examinadas, além de estar entre o grupo de populações onde a mediada do número de cópias de RNA foi mais baixo (log 5/ cabeça). Em contraste, a população de Puerto Maldonado 7 exibiu apenas resistência insípiente aos piretróides, exibiu taxa de disseminação de 23,3% e a mediada do número de cópias de RNA esteve próxima de log 10/ cabeça. Mousson et al. (2002), deduziram que a heterogeneidade nas taxas de disseminação e na estruturação genética populacional em *Ae. aegypti* de 15 localidades de Chiang Mai, no norte da Tailândia, eram potencialmente consequência das diferentes histórias de utilização espacial e temporal de inseticidas que, por sua vez dependiam de características locais, tais como endemicidade de dengue, da densidade populacional humana e tipo de depósito mais frequente como criadouro. Assim, nas cidades tailandesas densamente povoadas, *Ae. aegypti* colonizaria numerosos criadouros temporários favorecendo a persistência de populações geneticamente estruturadas. Nos arredores, colonizaria criadouros maiores e perenes ao longo do ano. Estes seriam produtores de larvas durante todo o ano, mesmo durante a estação seca, e seriam menos sujeitos a tratamentos com inseticidas (Mousson et al. 2002; Huber et al. 2003). Assim, condições climáticas muito distintas, especialmente quanto aos regimes de chuvas, oferta de água potável com precariedades marcadamente diferentes e variações não desprezíveis na densidade demográfica e do uso de inseticidas para diversos fins

registradas no Peru, seriam fatores importantes na determinação da variabilidade genética das populações do vetor, o que influenciaria tanto a competência vetorial quanto o perfil de resistência a inseticidas.

### 5.5. Considerações finais

Nós demonstramos que: **(1)** a densidade de *Ae. aegypti* nas diferentes áreas amostradas com ovitrampas é elevada, ainda que com heterogeneidade entre regiões, **(2)** as taxas de infecção de disseminação de *Ae. aegypti* para o DENV-2 genótipo América/Ásia foram heterogêneas no Peru, **(3)** as populações peruanas de *Ae. aegypti* apresentaram variação nos títulos de replicação de DENV-2 genótipo América/Ásia no tecido da cabeça de mosquito a 14° e 21° dpi e **(4)** é possível estar havendo vantagem adaptativa de genótipo América/Ásia que circula de modo simpátrico com a população do mosquito no Peru. Tendo em conta estes resultados em conjunto com **(a)** os conhecidos altos índices de infestação predial de *Ae. aegypti* relatados nas três regiões naturais do país (Tabela 3), **(b)** a existência de vastas áreas urbanas com o descontínuo ou precário abastecimento de água (MINSA 2010), **(c)** a co-circulação dos quatro sorotipos (Arrasco 2011) e genótipos mais invasivos e que desencadeiam doença com manifestações mais graves de dengue (Rico-Hesse 2003; Mamani et al. 2011), **(d)** a dinâmica populacional humana interna, que matem fluxos permanentes entre as regiões (MINSA 2011) e **(d)** a alta proporção de humanos não imunes, conclui-se a existência de epidemias importantes de dengue no Peru. Vários fatores ecológicos, epidemiológicos e climático-ambientais devem modular o risco das diferentes regiões.

Se na costa norte e na Amazônia as temperaturas médias são essencialmente elevadas e semelhantes entre si ao longo do ano, aquelas da selva alta tendem a apresentar flutuações importantes, ou melhor, períodos de temperaturas mínimas baixas, não compatíveis com o desenvolvimento do vetor e

com a replicação viral no mosquito, diminuindo a densidade populacional do mosquito e aumentando o período de incubação viral no mosquito, dois fatores que limitam a transmissão. Em condições laboratoriais o PIE tem uma duração de 12 dias a temperatura constante de 30°C e de 7 dias entre 32°C e 35°C (Watts et al. 1987). Em estudos recentes têm-se demonstrado que o DENV pode atingir as glândulas salivares no mosquito infectado já no 4º d.p.i a 28°C (Salazar et al. 2007), embora na maioria dos indivíduos isso ocorre a partir de 10 dias. Portanto, a transmissão depende de mosquitos mais longevos.

Por outro lado, a região da costa se distingue da Amazônia neste particular, pois tem uma característica própria que é a escassa pluviosidade, que não permite gerar suficientes criadouros de *Ae. aegypti* a céu aberto, condição em parte superada pelos numerosos recipientes que ficam no interior do domicílio para armazenar água em vista da irregularidade de abastecimento de água, diferindo da Amazônia, onde a farta chuva permite a formação anual de criadouros. Esse resumo das condições ambientais e climáticas das três regiões naturais do Peru será discutido a seguir à luz da ecologia, epidemiologia e capacidade vetorial das populações do vetor

A dinâmica de transmissão da dengue é influenciada por o determinantes da capacidade vetorial (Trpis & Hausermann 1986; Luz et al. 2003; Maciel-de-Freitas 2010). Kuno (1995) destaca a importância da compreensão dos fatores que regulam a transmissão da dengue: fatores climatológicos, densidade do vetor e incidência de dengue. A competência vetorial é um dos fatores da capacidade vetorial (Kramer & Ebel 2003) que, por sua vez, é influenciado por fatores ambientais (Lambrechts et al. 2011).

Lambrechts et al. (2011) demonstraram experimentalmente que a intensidade da transmissão de DENV seria influenciada pela combinação da temperatura média e a faixa de flutuações das temperaturas máxima e mínima diárias. Para esses autores, a variação de temperatura diária influencia nas interações vetor-patógeno. Assim, variações diárias e sazonais, como as observadas nas localidades de selva alta, por exemplo, influenciariam a dinâmica

de transmissão do DENV e levaria à heterogeneidade no risco de doenças transmitidas por vetores, uma vez que a faixa diária de valores da temperatura pode influenciar negativamente em dois componentes importantes da capacidade vetorial: competência e sobrevivência do vetor.

A maior quantidade de ovos foi obtida na região da amazônia, seguido pela região da costa e a selva alta. Na região da **costa**, as chuvas só ocorrem nos meses janeiro a abril, mesmo assim, não excedem 1000 mm. Embora o Peru esteja numa zona tropical e a costa norte esteja próxima à linha equatorial, a característica particular do regime de chuvas desta região peruana ajudaria a gerar padrões de abundância de *Ae. aegypti* diferentes daqueles verificados em outras áreas tropicais e sub-tropicais onde há transmissão de dengue (Kuno 1995; Kramer & Ebel 2003; Honório et al. 2009). As observações feitas por Chowell et al. (2011), sobre epidemiologia de dengue no Peru, apoiam esta teoria. Estes autores descreveram características das epidemias de dengue na amazônia e a na costa. Foi observado haver diferenças no surgimento de epidemias entre estas duas regiões, havendo associação significativa entre o aparecimento das mesmas com o ciclo sazonal da temperatura média. Segundo os autores, o dengue é frequentemente importado para a região da costa a partir de casos adquiridos em focos de áreas endêmicas da amazônia e/ou de cidades de outros países endêmicos vizinhos onde as condições ambientais são propícias para promover a reprodução local do mosquito durante todo o ano, diferentemente do que ocorre na costa (Watts et al. 1998; Cabezas 2005a; Maguiña et al. 2005; Chowell et al. 2011). Para Chowell et al. (2011), reduzindo-se a transmissão de dengue nas áreas tropicais onde a transmissão é persistente, pode-se reduzir significativamente a incidência de dengue em áreas da costa, onde o número de casos normalmente já atinge níveis baixos durante a estação seca. Com efeito, a competência vetorial mais baixa para as populações de *Ae. aegypti* da costa norte (LCU e SCE) por nós observada pode ser também um fator determinante para essa situação epidemiológica.

Na amazônia, fizemos amostragens de *Ae. aegypti* em duas regiões – nordeste e sudeste -, cujos resultados foram diversos. As coletas nas localidades Puerto Maldonado setor 7 e Puerto Maldonado setor 9, em Madres de Dios, no Sudeste, observou-se uma queda nos índices de ovitrampas positivas e de densidade de ovos por ovitrampa entre as coletas feitas na primavera e outono. A temperatura média mínima menor no outono (17,8°C) seguramente reduz a densidade de mosquitos no sudeste amazônico do Peru. Temperaturas diárias menores que 20°C têm efeito negativo na abundância de *Ae. aegypti*, parâmetro que fortemente associado com a transmissão de dengue (Domínguez et al. 2000). No entanto, nas localidades do nordeste amazônico peruano, não se observa baixa na temperatura mínima média. Segundo nossos resultados para as populações de *Ae. aegypti* de San Juan e Punchana o número de ovos coletados se manteve semelhante ou aumentou. Isso deve ser resultado das leves flutuações de temperaturas médias observados nas estações de primavera e outono. As precipitações pluviométricas seguem um padrão sazonal semelhante no sudeste e nordeste amazônico peruanos. Com isso, os padrões sazonais de densidade de mosquitos e de transmissão de dengue nestas regiões se assemelham aos observados em outras áreas subtropicais e tropicais do continente (Domínguez et al. 2000; Honório et al. 2009), onde o número máximo de ovos de *Ae. aegypti* tem sido associado ao período de altas temperaturas e pluviometria. Historicamente, a principal área epidêmica a endêmica de dengue no Peru é o nordeste amazônico, especialmente o departamento de Loreto, ao passo que as epidemias reportadas no sudeste, em Madre de Dios, são de escalas bem menores. Essa diferença pode ter várias explicações, dentre as quais salientamos a mais baixa densidade demográfica e as flutuações mais acentuadas na temperatura média mínima no sudeste. Porém, no que concerne à competência vetorial, as populações testadas do mosquito tiveram taxas de disseminação e título viral disseminado para a cabeça semelhante. Interessante notar que Yáñez et al. (2013), encontrou diferenças interessantes na variabilidade genética de *Ae. aegypti* destas duas áreas amazônicas.

A temperatura deve ser um fator bastante limitante para a transmissão de dengue na zona de **selva alta**. Com efeito, merecem menção especial as flutuações diárias nas temperaturas que ocorre especificamente nesta região como observado nas localidades Santa Leonor e Rio Negro durante a amostragem que conduzimos, onde as temperaturas diminuem até níveis de médias mínimas de cerca de 10°C, ainda que em algumas situações chegue a máximas 30°C. Tal variação tem um grande impacto na densidade e atividade de *Ae. aegypti*, reduzindo grandemente a intensidade de transmissão ou mesmo impedindo a veiculação do vírus dengue em parte do ano (Reiter et al. 1991). Esta situação se assemelha ao que ocorre em áreas de clima temperado e subtropical, onde a densidade do vetor é muito baixa durante o período mais frio (Vezzani et al. 2004). Foi observado que a densidade de ovos de *Ae. aegypti* diminuiu, mas não atingiu o nível zero nas coletas feitas nesta região peruana. Com efeito, ovitrampas iscadas com infusão de feno têm a alta sensibilidade para detectar a presença do vetor (Reiter et al. 1991; Reiter et al. 1995; Lourenço-de-Oliveira et al. 2008). É provável que os adultos de *Ae. aegypti* não sobrevivam ou tenham muito baixa atividade durante o outono e inverno. Os embriões devem sobreviver nos ovos para dar origem a uma nova geração na primavera seguinte, quando a população pode se reestabelecer (Domínguez et al. 2000; Vezzani & Carbajo 2008). Ou seja, a região é receptiva e de alta vulnerabilidade para dengue. Assim, na selva alta peruana, epidemias ocorrem depois da introdução de casos de dengue adquiridas em outras áreas endêmicas ou epidêmicas. Uma vez que as populações da selva alta testadas quanto à capacidade vetorial estiveram entre aquelas que exibiram as mais elevadas taxas de disseminação para DENV-2, há elevado risco de epidemias nesta região com a circulação de indivíduos virêmicos durante períodos do ano em que a temperatura média é compatível com o desenvolvimento do mosquito e com a replicação do vírus no vetor.

## 6. Conclusões

- As densidades populacionais de *Ae. aegypti* nas três regiões naturais do Peru são geralmente elevadas, o que as tornam receptivas à transmissão de dengue e vulneráveis à ocorrência de epidemias, em vista da circulação de quatro sorotipos virais no país e da movimentação humana interna entre áreas com transmissão perene e com epidemias cíclicas no próprio país ou em países vizinhos.
- As maiores densidades de *Ae. aegypti* foram registradas na parte nordeste da Amazônia, onde ocorrem a maior incidência anual de casos de dengue.
- Com a utilização das ovitrampas, foi possível detectar variações importantes na densidade de *Ae. aegypti* entre as estações da primavera e outono nas diferentes áreas estudadas.
- Não houve diferença entre papel-toalha e paleta de madeira quanto à eficiência para a coleta de ovos de *Ae. aegypti* em ovitrampas
- As populações de *Ae. aegypti* provenientes de seis localidades: La Curva (Tumbes) e Sanchez Cerro (Piura) da região Costa, Punchana (Loreto) e Puerto Maldonado setor 7 (Madre de Dios) da região Amazonia, e Bagua Grande (Amazonas) e Rio Negro (Junin) da região de selva alta do Peru, são consideradas competentes para transmitir vírus dengue, pelo menos o DENV-2 genótipo América/Ásia, ainda que difiram quanto aos indicadores deste fenótipo, como a taxa de disseminação e carga viral disseminada.
- A heterogeneidade na taxa de disseminação do DENV-2 peruanos pode refletir a variabilidade fitogeográfica da origem das populações de *Ae. aegypti*

testadas, que por sua vez possivelmente influencia a variabilidade genética das mesmas.

- Observamos uma alta variação nos níveis máximos e mínimos dos títulos de cópias de RNA por cabeças de mosquitos em que houve disseminação da infecção, mas que não teve correlação com a taxa de disseminação na respectiva população, dado que reforça a hipótese de que esses dois indicadores possam ser em grande parte independentemente controlados.
- A resistência à alfacipermetrina em populações de *Ae. aegypti* é preocupante, pois parece crescente no país, ao mesmo tempo em que as populações ainda apresentam níveis de resistência incipiente para deltametrina e sejam sensíveis para malation.
- Ainda que possuam populações de *Ae. aegypti* competentes para transmitir o vírus dengue e com perda da susceptibilidade a piretroides, o risco de epidemias nas regiões da costa e selva alta é possivelmente ainda limitado por fatores climáticos e ecológicos.

## 7. Perspectivas

- Uma vez que detectamos, variações consideráveis na densidade de ovos ou no índice de ovitrampas positivas entre as estações de outono e primavera, pensamos em realizar um estudo com amostragens quinzenais ou semanais, a longo prazo, em localidades das diferentes regiões fitogeográficas do Peru, para avaliar dinâmica da densidade populacional do *Ae. aegypti*, analisando a influência de fatores climáticos e os padrões de distribuição espacial do mosquito. Os resultados de uma avaliação desta natureza podem ajudar muito na vigilância de transmissão de dengue e, sobretudo, orientar as medidas distintas de controle de acordo com a região, como a supressão de criadouros focais nas localidades de clima seco e com temperaturas mínimas que descem a níveis baixos durante certas épocas do ano.
- Existem variações nos indicadores de determinação da competência vetorial nos *Ae. aegypti* do Peru amostrados em uma mesma região natural. Acreditamos que uma avaliação comparativa desses indicadores em mais populações de uma mesma região, em diferentes momentos do ano e com maior número de réplicas pode oferecer um quadro mais claro do padrão de susceptibilidade das populações estudadas. Além disso, dois indicadores que não puderam ser avaliados no presente estudo, a taxa de infecção viral na saliva e o título viral na saliva dos mosquitos – poderiam ser incluídas, de modo a dar mais robustez às conclusões.
- Ainda considerando a variabilidade na competência vetorial dentro e entre as regiões do Peru, e sabendo-se que este fenótipo é determinado geneticamente, julgamos ser interessante aproveitar o material de *Ae. aegypti* já coletado e armazenado à baixa temperatura procedentes das distintas

localidades e duas épocas do ano, para se realizar um estudo de genética de populações.

- Ainda considerado a disponibilidade do material supracitado, e a existência de resistência a inseticidas piretroides, pensamos seria interessante genotiparlo quanto a mutações Kdr nas populações de *Ae. aegypti* do Peru.
- Já que apenas um pequeno número de indivíduos por população de *Ae. aegypti* pode ser avaliado quanto à carga viral disseminada quando se buscou avaliar a existência de vantagem adaptativa entre genótipos do vírus e do mosquitos, planejamos ampliar a amostragem e as réplicas desse tipo de abordagem, assim como testar diferentes amostras de uma mesmo sorotipo, genótipo e linhagem frente a uma mesma população de mosquito simpátrico.

## 8. Referências bibliográficas

- Amraoui F, Krida G, Bouattour A, Rhim A, Daaboub J, Harrat Z, Boubidi SC, Tijane M, Sarih M and Failloux AB 2012. "Culex pipiens, an Experimental Efficient Vector of West Nile and Rift Valley Fever Viruses in the Maghreb Region." *PLoS ONE* 7(5): e36757.
- Arata AA, Ruebush II TK, Porter CH, Stein JD, Lounibos LP and Molina de Fernández D 1999. "ACTIVITY REPORT No. 60. Malaria in the Peruvian Amazon: A Review of the Epidemiology, Entomology, and Insecticide Resistance of Vectors." *Environmental Health Project*.
- Arce J 1919. "Sobre la supuesta endemicidad de la fiebre amarilla en la costa del Perú." *Anales de la Facultad de Medicina de Lima* Tomo II(Suplemento): 93-133.
- Armstrong PM and Rico-Hesse R 2003. "Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg* 68(5): 539-544.
- Arrasco J 2011. "Situación del dengue en el Perú." *Bol Epidemiol (Lima)*. 20(33): 693-696.
- Balta R and Villaseca P 2005. Determinación de la susceptibilidad del mosquito *Aedes aegypti* a los insecticidas de uso en salud pública en áreas de riesgo de transmisión de dengue y dengue hemorrágico. I. N. d. Salud. Lima.
- Bancroft TL 1906. "On the etiology of dengue fever." *Austr Med Gazette* 25: 17-18.
- Beerntsen BT, James AA and Christensen BM 2000. "Genetics of Mosquito Vector Competence." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1): 115-137.
- Bennett KE, Olson KE, Muñoz ML, Fernández-Salas I, Farfán JA, Higgs S, Black WC and 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(1): 85-92.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers F, George DB, Jaenisch T, Wint

- GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ and Hay SI 2013. "The global distribution and burden of dengue." *Nature* 496.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D and Palomino M 2007. "Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú." *Rev Cubana Med Trop* 59(3): 202-208.
- Black WCIV, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barrilas-Mury CV, Fernandez-Salas I, Munoz ML, Farfan-Ale JÁ, Olson KE and Beaty BJ 2002. "Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*." *Archives of Medical Research* 33: 379–388.
- Bosio CF, Beaty BJ and Black WC 4th. 1998. "Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg* 59(6): 965-970.
- Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ and IVWC Black 2000. "Quantitative Trait Loci That Control Vector Competence for Dengue-2 Virus in the Mosquito *Aedes aegypti*." *Genetics* 156: 687–698.
- Brathwaite O, San Martín Jose L, Montoya RH, Del Diego J, Zambrano B and Dayan GH 2012. "Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas." *Am J Trop Med Hyg* 87(4): 584-593.
- Brogdon WG and McAllister JC. 1998. "Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles." *J Am Mosq Control Assoc* 14: 159-164.
- Brogdon WG and Chan A 2013. "Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. Centers for Disease Control and Prevention.": 1-28.
- Bruce-Chwatt L. J. 1979. "The Manson Oration, May 1979. Man against malaria: conquest or defeat." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73(6): 605-617.
- Bueno C, Vela F, Llontop A and Carranza J 1998. Dengue en San Martín: Seis años de experiencia. *Hojas Amazónicas de Salud Pública*, Proyecto VIGIA-MINSA Perú. 2: 17-26.
- Cabezas C 2005a. "Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22(3): 212-228.

- Cabezas C 2005b. "Editorial. Reemergencia del Dengue en Lima: Crónica de una Enfermedad anunciada " *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22(3): 159-160.
- Cardosa J, Ooi MH, Tio PH, Perera D, Holmes EC, Bibi K and Manap ZA 2009. "Dengue Virus Serotype 2 from a Sylvatic Lineage Isolated from a Patient with Dengue Hemorrhagic Fever." *PLoS Negl Trop Dis* 3(4): e423.
- Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L and Scott TW 2013. "Fluctuations at a Low Mean Temperature Accelerate Dengue Virus Transmission by *Aedes aegypti*." *PLoS Negl Trop Dis* 7(4): e2190.
- Carvalho-Leandro D, Ayres CFJ, Guedes DRD, Suesdek L, Melo-Santos MAV, Oliveira CF, Cordeiro MT, Regis LN, Marques ET, Gil LH and Magalhaes T 2012. "Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2." *Acta Tropica* 124: 113–119.
- Castro MG, Nogueira RM, Schatzmayr H, Miagostovich M and 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(8): 809-814.
- Chen R and Vasilakis N 2011. "Quo tu et quo vadis?" *Viruses* 3: 1562-1608.
- Chowell G, Cazelles B, Broutin H and Munayco C 2011. "The influence of geographic and climate factors on the timing of dengue epidemics in Perú,1994-2008." *BMC Infectious Diseases* 11(164): 1-14.
- Consoli RAGB and Lourenço-de-Oliveira R 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*Fiocruz, Rio de Janeiro.225 pp
- Craig GB 1967. "Genetic Control of *Aedes aegypti*." *Bull World Health Organ* 36: 628-632.
- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE and Valle D 2005. "Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.

- da Costa-da-Silva AL, Capurro ML and Bracco JE 2005. "Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(6): 539-544.
- de Melo DPO, Scherrer LR and Eiras AE 2012. "Dengue Fever Occurrence and Vector Detection by Larval Survey, Ovitrap and MosquiTRAP: A Space-Time Clusters Analysis." *PLoS ONE* 7(7): e42125.
- Degallier N 2001. "Estudos Experimentais sobre Competência Vetorial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para os Vírus da Dengue e Febre Amarela." *Informe Epidemiológico do SUS* 10((Supl. 1)): 9-11.
- Diallo M, Baa Y, Faye O, Soumareb ML, Diaa I and Sall AA 2008. "Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 493-498.
- Dirección General de Epidemiología 2011. "Editorial. Situación actual del dengue en el Perú." *Bolletín Epidemiológico* 20(33): 693-696.
- Domínguez C, Ludueña Almeida FF and Almirón W 2000. "Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba Capital." *Rev Soc Entomol Argent* 59(1-4): 41-50.
- Failloux AB, Vazeille M and Rodhain F 2002. "Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*." *J Mol Evol* 55: 653-663.
- Fay RW and Eliason DA 1966. "A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*." *Mosquito News* 26(4): 531-535.
- Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhartc A and Brogdon WG 2010. "Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia." *Pest Manag Sci* 67: 430-437.
- Forshey BM, Morrison AC, Cruz C, Rocha C, Vilcarrromero S, Guevara C, Camacho DE, Alava A, Madrid C, Beingolea L, Suarez V, Comach G and Kochel TJ 2009. "Dengue virus serotype 4, northeastern Peru, 2008." *Emerg Infect Dis* 15(11): 1815 -1818.

- Fouque F, Vazeille M, Mousson L, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Rodhain F and Failloux AB 2001. "*Aedes aegypti* in French Guiana: susceptibility to a dengue virus." *Trop Med Int Health* 6(1): 76-82.
- Franco L, Palacios G, Martinez JA, Vazquez A, Savji N, De Ory F, Paz M, Martin D, Lipkin WI and Tenorio A 2011. "First Report of Sylvatic DENV-2-Associated Dengue Hemorrhagic Fever in West Africa." *PLoS Negl Trop Dis* 5(8): e1251.
- Getis A, Morrison AC, Gray K and Scott TW 2003. "Characteristics of the spatial pattern of the dengue vector, *Aedes aegypti*, in Iquitos, Peru." *Am J Trop Med Hyg* 69(5): 494-505.
- Griffitts DHT 1934. "Fiebre amarilla: importancia de algunas fases relativamente nuevas en relación con su profilaxia en los focos antiguos y nuevos." *Bol Of Sanit Panam* 13: 511-518.
- Gubler DJ and Rosen L 1976. "Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue viruses." *Am J Trop Med Hyg* 25(2).
- Gubler DJ, Nalim N, Tan Tan, Saipan H and Sulianti Saroso J 1979. "Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg* 28(6): 1045-1052.
- Gubler DJ 1989. "*Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-Borne disease control in the 1990s: Top down or bottom up " *Am J Trop Med Hyg* 40(6): 571-578.
- Gubler DJ and Kuno G 1997. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*In: Gubler DJ, Kuno G (eds.) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International, Wallingford, UK, 1997, pp. 1-22.). CAB International, Wallingford.UK
- Gubler DJ 1998a. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." *Clin Microbiol Rev* 11(3): 480.
- Gubler DJ 1998b. "Special Issue. Resurgent Vector-Borne Diseases as a Global Health Problem." *Emerg Infect Dis* 4(3).

- Gubler DJ 2011. "Prevention and Control of Aedes aegypti-borne Diseases: Lesson Learned from Past Successes and Failures." *AsPac J Mol Biol Biotechnol* 19(3): 111-114.
- Gutiérrez V, Palomino M, Olivares M and Noroña G 2005. "Comunicación Corta. Aislamiento Rápido del virus Dengue 3 por el Método de Shell Vial en el Brote de Dengue en Lima " *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22(3).
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S and Peeling RW 2010. "Review. Dengue: a continuing global threat." *Nat Rev Microbiol* 8(Dec (12 Suppl)): S7-S16.
- Guzman MG and Vazquez S 2010. "The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection." *Viruses* 2(2649-2662).
- Halstead SB 1980. "Dengue haemorrhagic fever- a public health problem and a field for research." *Bull World Health Organ* 58(1): 1-21.
- Halstead SB 2008. *Tropical Medicine: Science and Practice*. Dengue.(5). London, Imperial College Press.475
- Hammon W. M. 1973. "Dengue hemorrhagic fever--do we know its cause?" *Am J Trop Med Hyg* 22(1): 82-91.
- Hanley KA , Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL and Vasilakis N 2013. "Fever versus Fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus." *Infect Genet Evol* Article in press.
- Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD and Reeves WC 1983. "Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses." *Ann Rev Entomol* 28: 229-262.
- Honorio NA, Silva Wda C, Leite PJ, Goncalves JM, Lounibos LP and Lourenco-de-Oliveira R 2003. "Dispersal of Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(2): 191-198.

- Honório NA, Codeço CT, Alves FC, Magalhães MA and R Lourenço-De-Oliveira 2009. "Temporal distribution of *Aedes aegypti* in different districts of Rio de Janeiro, Brazil, measured by two types of traps." *J Med Entomol* 46(5): 1001-1014.
- Huber K, Luu Le Loan, Tran Huu Hoang, Tran Khanh Tien, Rodhain F and Failloux AB 2002. "Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam)." *Heredity* 89: 7-14.
- Huber K, Loan LL, Hoang TH, Tien TK, Rodhain F and Failloux AB 2003. "Aedes aegypti South Vietnam: Ecology, Genetic Structure, Vectorial Competence and Resistance to Insecticides " *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34(1).
- Igarashi A 1978. "Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses." *J gen ViroL* 40: 531-544.
- Instituto Nacional de Salud 2002. Distribución de los principales insectos vectores de enfermedades en el Perú. C. N. d. S. Pública. *Documento Técnico. Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes*. 4: 16-22.
- Jakob WL, Fay RV, Windguth V and Schppf HF 1970. "Evaluation of materials for ovitrap paddles in *Aedes aegypti* surveillance." *J Econ Entomol* 63(3): 1013-1014.
- Johansson MA, Dominici F and Glass GE 2009. "Local and Global Effects of Climate on Dengue Transmission in Puerto Rico." *PLoS Negl Trop Dis* 3(2): e382.
- Johnson BW, Russell BJ and Lanciotti RS 2005. "Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay." *J Clin Microbiol* 43: 4977- 4983.
- Joshi V, Singh M and Mourya DT 2003. "Studies on determination of possible role of *Aedes albopictus* mosquitoes in maintenance of urban cycle of dengue." *Desert Medicine Research Centre (Indian Council of Medical Research) Jodhpur: Annual Report*. 58–65.

- Joy DA, Gonzalez-Ceron L, Carlton JM, Gueye A, Fay M, McCutchan TF and Su XZ 2008. "Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria." *Mol Biol Evol* 25(6): 1245-1252.
- Kloter KO, Bowman DD and Carroll MK 1983. "Evaluation of some ovitrap materials used for *Aedes aegypti* surveillance." *Mosquito News* 43(4): 438-441.
- Kochel TJ Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, Caceda R, Bautista CT, Montoya Y, Douglas S, Russell KL. 2002. "Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever." *Lancet* 360(9329): 310-312.
- Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR and Triana C 1989. "Dengue Haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lesson from de cuban epidemic, 1981." *Bull World Health Organ* 64(4): 375-380.
- Kramer LD, Hardy JL and Presser SB 1983. "Effect of temperature of extrinsic incubation on the vector competence of *Culex tarsalis* for western equine encephalomyelitis virus." *Am J Trop Med Hyg* 32(5): 1130-1139.
- Kramer LD and Ebel GD 2003. "Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes." *Adv Virus Res* 60: 187-232.
- Krogstad D. J. 1996. "Malaria as a reemerging disease." *Epidemiol Rev* 18(1): 77-89.
- Kuno G 1995. "Review of the factors modulating dengue transmission." *Epidemiol Rev* 17(2): Epidemiol Rev. 1995;1917(1992):1321-1935.
- Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG and Scott TW 2009. "Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors." *BMC Evolutionary Biology* 9(160): 1-11.
- Lambrechts L 2010. "Dissecting the Genetic Architecture of Host–Pathogen Specificity." *PLoS Pathogens* 6(8): 1-3.
- Lambrechts L, Scott TW and Gubler DJ 2010. "Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission." *PLoS Negl Trop Dis* 4(5): e646.

- Lambrechts L 2011. "Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm?" *Trends in Parasitology* 27(3): 111-114.
- Lambrechts L, Paaijmans KP, Fansiria T, Carrington LB, Kramer LD, Thomas MB and Scott TW 2011. "Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*." *PNAS* 108(18): 7460–7465.
- Lambrechts L, Thanyalak F, Pongsiri A, Thaisomboonsuk B, Klungthong C, Richardson JH, Ponlawat A, Jarman RG and Scott TW 2012. "Dengue-1 Virus Clade Replacement in Thailand Associated with Enhanced Mosquito Transmission." *J Virol* 86(3): 1853–1861.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ and Vorndam V 1992. "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* 30(545-51).
- Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ and Trent DW 1994. "Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses." *J Gen Virol* v. 75: 65-75.
- Lastres J 1951. *Historia de la Medicina Peruana. La Medicina en la República*. Lima, UNMSM. 245-256
- Lavergne A, Lacoste V, Germain A, Matheus S, Dussart P, Deparis X and Thoisy B 2009. "Infection par le virus de la dengue de mammifères sauvages en région néotropicale : hôtes accidentels ou réservoirs potentiels?" *Med Trop* 69: 345-350.
- Leiva N and Cáceres O 2004. "Variabilidad genética de *aedes aegypti* en algunas áreas del Perú usando single stranded conformational polymorphism (SSCP)." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 21(3): 157-166.
- Lewis JA, Ghang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW and Trent DW 1993. "Phylogenetic relationships of dengue-2 virus." *Virology* 197(1): 216-224.
- Lofgren C. S. 1970. "Ultralow volume applications of concentrated insecticides in medical and veterinary entomology." *Annu Rev Entomol* 15: 321-342.

- Lourenco de Oliveira R, Vazeille M, De Filippis AMB and Failloux AB 2003. "Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and The Cayman Islands." *Am J Trop Med Hyg* 69(1): 105-114.
- Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, De Filippis AMB and Failloux AB 2004. "*Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 43-54.
- Lourenco-de-Oliveira R. Vazeille M., Filipis AMB, Failloux AB. 2004. "*Aedes aegypti* in Brazil: genitically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 98: 43-54.
- Lourenço-de-Oliveira R, Lima JB, Peres R, Alves Fda C, Eiras AE and Codeço CT 2008. "Comparison of different uses of adult traps and ovitraps for assessing dengue vector infestation in endemic areas." *J Am Mosq Control Assoc* 24(3): 387-392.
- Luz PM, Codeço CT, Massad E and Struchiner CJ 2003. "Uncertainties Regarding Dengue Modeling in Rio de Janeiro, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(7): 871-878.
- Maciel-de-Freitas R, Codeço CT and Lourenço-de-Oliveira R 2007. "Daily Survival Rates and Dispersal of *Aedes aegypti* Females in Rio de Janeiro, Brazil " *Am J Trop Med Hyg* 76(4): 659-665.
- Maciel-de-Freitas R, Peres RC, Souza-Santos R and Lourenco-de-Oliveira R 2008. "Occurrence, productivity and spatial distribution of keypremises in two dengue-endemic areas of Rio de Janeiro and their role in adult *Aedes aegypti* spatial infestation pattern." *Tropical Medicine and International Health* 13(12): 1488–1494.
- Maciel-de-Freitas R and Lourenço-de-Oliveira R 2009. "Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro, Brazil." *Rev Saúde Pública* 43(1): 8-12.

- Maciel-de-Freitas R, Souza-Santos R, Codeço CT and Lourenço-de-Oliveira R 2010. "Influence of the spatial distribution of human hosts and large size containers on the dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* within the first gonotrophic cycle." *Medical and Veterinary Entomology* 24: 74–82.
- Maciel-de-Freitas R 2010. "A review on the ecological determinants of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vectorial capacity " *Oecologia Australis* 14(3): 726-736.
- Maciel-de-Freitas R, Koella JC and Lourenco-de-Oliveira R 2011. "Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 452-458.
- Maciel-de-Freitas R Koellab JC, Lourenco-de-Oliveira R. 2011. "Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 452-458.
- Maguiña C, Osoreo F, Suárez L, Soto L and Pardo K 2005. "Dengue clásico y hemorrágico: Una enfermedad reemergente y emergente en el Perú. Dengue and dengue hemorrhagic fever: Emerging and re-emerging infectious diseases in Peru." *Rev Med Hered* 16(2): 120-140.
- Mamani EZ, García MM, Gutiérrez VP, C Cabezas and Harris E 2005. "Tipificación molecular del virus Dengue 3 durante el brote epidémico de Dengue Clásico en Lima, Peru, 2005 " *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22(3): 161-164.
- Mamani E, Álvarez C, García MM, Figueroa D, Gatti M, Guio H, Merino S, Valencia P, Calampa C, Franco L and Cabezas C 2011. "Circulación de un linaje diferente del virus dengue 2 genotipo America / Asia en la Región Amazónica del Perú, 2010." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28(1): 72-77.
- Martinez ET 2008. "Dengue." *Estud Av* 22(64): 33-52.
- Mendez MR 1987. "Contribución al estudio de la Fiebre Amarilla Selvática en el Perú". Doctor, Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima

- MINSA 2010. Análisis de la Situación de Salud del Perú. *Dirección General de Epidemiología*: 81-85.
- MINSA 2011. Aprendiendo de la experiencia: Lecciones aprendidas para la preparación y respuesta en el control vectorial ante brotes de dengue en el Perú / Ministerio de Salud. *Dirección General de Salud Ambiental*. Lima: 1-42.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA and Valle D 2007. "Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004." *Am J Trop Med Hyg* 77(3): 467–477.
- Montoya Y, Holechek S, Caceres O, Palacios A, Burans J, Guevara C, Quintana F, Herrera V, Pozo E, Anaya E, Mamani E, Gutierrez V, Ladron de Guevara A, Fernandez E, Asmat P, Alva-Davalos V, Holguin C, Laguna A, Morales AM, Minaya P and Kochel T 2003. "Circulation of Dengue Viruses in North-Western Peru, 2000-2001." *Dengue Bulletin* 27: 52-62.
- Morrison AC, Getis A, Santiago M, Rigau-Perez JG and Reiter P 1998. "Exploratory space-time analysis of reported dengue cases during an outbreak in Florida, Puerto Rico, 1991-1992" *Am J Trop Med Hyg* 58(3): 287–298.
- Mostorino R, Rosas A, Gutierrez V, Anaya E, Cobos M and García M 2002. "Manifestaciones clínicas y distribución geográfica de los serotipos del dengue en el Perú - año 2001." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 19(4): 171-180.
- Mousson L, Vazeille M, Chawprom S, Prajakwong S, Rodhain F and Failloux AB 2002. "Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Chiang Mai (Thailand) and relation with dengue transmission." *Tropical Medicine and International Health* 7(10): 865–872.
- Nguyen NM, Kien DTH, Tuan TV, Quyen NTH, Tran CNB, Thi LV, Thi DL, Nguyen HL, Farrar JJ, Holmes EC, Rabaa MA, Bryant JE, Nguyen TT, Nguyen HTC, Nguyen LTH, Pham MP, Nguyen HT, Luong TTH, Wills B, Nguyen CVV, Wolbers M and Simmons CP 2013. "Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(22): 9072–9077.

- Oliveira MF, Araújo JMG, Ferreira Jr. OC, Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, Schatzmayr HG, Tanuri A and Nogueira RMR 2010. "Two Lineages of Dengue Virus Type 2, Brazil." *Emerg Infect Dis* 16(3): 576-578.
- PAHO 1997. "The feasibility of eradicating *Aedes aegypti* in the Americas." *Rev Panam Salud Publica [online]* 1(1): 68-72.
- PAHO. 2001. "Dengue." <http://www1.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2001.htm>, acesso 30 de maio 2013.
- PAHO. 2009. "Dengue." [http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2010/dengue\\_cases\\_updated\\_2009\\_july\\_14.pdf](http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2010/dengue_cases_updated_2009_july_14.pdf), ultimo acesso 20 de maio 2013.
- PAHO. 2010. "Dengue." [http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2011/dengue\\_cases\\_2010\\_May\\_20.pdf](http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2011/dengue_cases_2010_May_20.pdf), ultimo acesso 20 de maio de 2013.
- PAHO. 2011. "Dengue." [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=264&Itemid=363](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363), ultimo acesso 20 de maio 2013.
- PAHO. 2012. "Dengue." [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=264&Itemid=363](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363), ultimo acesso 20 de maio 2013.
- Paupy C, Chantha N, Vazeille M, Reynes JM, Rodhain F and Failloux AB 2003. "Variation over space and time of *Aedes aegypti* in Phnom Penh (Cambodia); genetic structure and oral susceptibility to a dengue virus." *Genet Res Camb* 82: 171-182.
- Pepin KM, Lambeth K and Hanley KA 2008. "Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus." *BMC Microbiology* 8(28): 1-10.
- Phillips I, Need J, Escamilla J, Colán E, Sánchez S, Rodríguez M, Vásquez L, Seminario J, Betz T and Travassos da Rosa A 1992. "First documented outbreak of dengue in the peruvian amazon region." *Bulletin of PAHO* 26(3): 201-207.
- Pulgar-Vidal J 1981. *Geografía del Perú. Las Ocho Regiones Naturales del Perú* Lima – Perú, Editorial Universo
- Reed & Muench 1938. "A Simple Method of Estimating Fifty per cent Endpoints". *Am J Epidemiol* 27(3): 493-497.

- Reinert JF 1975. "Mosquito Generic and Subgeneric Abbreviations (Diptera: Culicidae)." *Mosquito Systematics* 7(2): 105-110.
- Reiter P, Amador MA and Colon N 1991. "Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations." *J Am Mosq Control Assoc* 7: 52-55.
- Reiter P, Amador MA, Anderson RA and Clark GG 1995. "Short Report: Dispersal of *Aedes aegypti* in an Urban Area after Blood Feeding as Demonstrated by Rubidium-Marked Eggs." *Am J Trop Med Hyg* 52: 177-179.
- Rico-Hesse R 1990. "Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature." *Virology* 174(2): 479-493.
- Rico-Hesse R 2003. "Microevolution and virulence of dengue viruses " *Adv Virus Res* 59: 315–341.
- Richardson J, Molina-Cruz A, Salazar MI and Black WIV 2006. "Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg* 74(1): 132–141.
- Rodriguez MM, Bisset JA and Fernandez D 2007. "Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Ae. aegypti* from some Latin American Countries." *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(4);, 2007 23(4): 420–429.
- Rosen L, Roseboom LE, Gubler DJ, Jih Ching Lien and Chaniotis BN 1985. "Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and japanese encephalitis viruses." *Am J Trop Med Hyg* 34(3): 603-615.
- Rutledge LC, Ward RA and Gould DJ 1964. "Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder." *Mosquito News* 24(4): 407-419.
- Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE and Beaty BJ 2007. "Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes." *BMC Microbiology* 7(9): 1-13.

- Salazar MI, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Olson KE and Beaty BJ 2010. "American and American/Asian genotypes of dengue virus differ in mosquito infection efficiency: candidate molecular determinants of productive vector infection." *Rev Biomed* 21: 121-135.
- San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH and Guzmán MG 2010. "The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality." *Am J Trop Med Hyg* 8(1): 128-135.
- Schoepp RJ and Beaty BJ 1984. "Titration of Dengue Viruses by Immunofluorescence in Microtiter Plates." *J CLIN MICROBIOL*: 1017-1019
- Service MW 1992. "Review. Importance of Ecology in *Aedes aegypti* Control." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23(4): 681-690.
- Service MW 1993. *Mosquito Ecology. Field Sampling Methods* London, CHAPMAN & HALL
- Severo OP 1958. "Evolución de la campaña anti-Aegyti en los últimos diez años." *Bol Of Sanit Panam* 45: 375-386.
- Sevilla CA, Cáceres AG, Vaquerizo A, Ibañez-Bernal S and Cachay LS 2001. "Reappearance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Lima, Peru." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(5): 657-658.
- Siqueira JB, Martelli CMT, Coelho GE, Simplício ACR and Hatch DL 2005. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002." *Emerg Infect Dis* 11(1).
- Smartt CT, Kim AP, Grossman GL and James AA 1995. "The Apyrase gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, is expressed specifically in the adult female salivary glands." *Exp Parasitol* 81(3): 239-248.
- Soper FL 1963. "The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*." *Am J Public Health* 53: 7-16.
- Tabachnick WJ 2013. "Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in Mosquito Arbovirus Transmission Competence." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(1): 249-277.

- Tardieux I, Poupel O, Lapchin L and Rodhain F 1990. "Variation among strains of *Aedes aegypti* in susceptibility to oral infection with dengue virus type 2 " *Am J Trop Med Hyg* 43(3): 308-313.
- Thoisy B, Dussart P and Kazanji M 2004. "Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana." *Trans R Soc Trop Med* 98: 409-412.
- Thoisy BD, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán JL, Colón C, Mauffrey JF, Delaval M, Catzeflis F, Kazanji M and Matheus S 2008. "Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals." *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 157-170.
- Toma T, Sakamoto S and Miyagi I 1982. "The seasonal appearance of *Aedes albopictus* in Okinawajima, the Ryukyu Archipelago, Japan." *Mosquito News* 42: 179-183.
- Torres JR and Castro J 2007. "The health and economic impact of dengue in Latin America." *Cad Saúde Pública* 23(Sup 1): S23-S31.
- Trpis M and Hausermann W 1986. "Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases." *Am J Trop Med Hyg* 35(6): 1263-1279.
- Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, Lloyd G and Holmes EC 2002. "Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus." *Virology* 298(63–72).
- Twiddy SS, Pybus OG and Holmes CE 2003. "Comparative population dynamics of mosquito-borne flaviviruses." *Infect Genet Evol* 3(2): 87-95.
- Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E and Failloux AB 1999. "Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia." *Am J Trop Med Hyg* 60(2): 292-299.
- Vazeille M, Rosen L, Mousson L and Failloux AB 2003. "Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg* 68(2): 203-208.

- Vazeille M, Yébakima A, Lourenço-de-Oliveira R, Andriamahefazafy B, Correira A, Rodrigues JM, Veiga A, Moreira A, Leparç-Goffart I, Grandadam M and Failloux AB 2013. "Oral receptivity of *Aedes aegypti* from Cape Verde for yellow fever, dengue, and chikungunya viruses." *Vector Borne Zoonotic Dis* 13(1): 37-40.
- Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M and Failloux AB 2013. "High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France." *PLoS One* 8(3): e59716.
- Vezzani D, Velázquez SM and Schweigmann N 2004. "Seasonal Pattern of Abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(4): 351-356.
- Vezzani D and Carbajo AE 2008. "*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(1): 66-74.
- Villaseca PC, León WC, Palomino M, Mostorino R and Lecca LG 2001. "Validación de sustratos atractivos a oviposición para la detección del *Aedes aegypti*." *Rev Med Exp Salud Pública* 18(3-4): 77-81.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett ADT, Watowich SJ, Gubler DJ and Weaver SC 2000. "Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses." *Journal of Virology* 74(7): 3227-3234.
- Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE and Nisalak A 1987. "Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus." *Am J Trop Med Hyg* 36(1): 143-152.
- Watts DM, Ramirez G, Cabezas C, Wooster MT, Carrillo C, Chuy M, Gentrau EJ and Hayes CG 1998. "Arthropod-Borne viral diseases in Peru In: Ed. Travassos da Rosa AP, Vasconcelos PF, Travassos da Rosa JF. An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries." *Belém Instituto Evandro Chagas*: 193-218.
- Weaver S and Vasilakis N 2009. "Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and

- epidemiology of the preeminent arboviral disease." *Infect Genet Evol* 9(4): 523-540.
- WHO 1958. *Insect resistance and vector control eighth report of the expert committee on insecticides*. Technical Report Series.(153). Ginebra, World Health Organization.1-63
- WHO 2009. *Dengue - Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*.WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.(Ginebra, World Health Organization.160
- Wilson M.E and Chen LH 2002. "Dengue in the Americas." *Dengue Bulletin* 26: 44-61.
- Wong J, Astete H, Morrison AC and Scott TW 2011. "Sampling Considerations for Designing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Oviposition Studies in Iquitos, Peru: Substrate Preference, Diurnal Periodicity, and Gonotrophic Cycle Length." *J Med Entomol* 48(1): 45–52.
- Yáñez P, Mamani E, Valle J, García MP, León W, Villaseca P, Torres D and Cabezas C 2013. "Genetic variability of *Aedes Aegypti* determined by mitochondrial gene ND4 analysis in eleven endemic areas for dengue in Peru." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 30(2): 246-250.
- Zamora E, Balta R, Palomino M, Brogdon WG and Devine GJ 2009. "Research Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon." *Malaria Journal* 8(208): 1-11.
- Zhang M, Zheng X, Wu Y, Gan M, He A, Li Z, Liu J and Zhan X 2010. "Quantitative Analysis of Replication and Tropisms of Dengue Virus Type 2 in *Aedes albopictus*." *Am J Trop Med Hyg* 83(3): 700–707.