

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

Duschinka Ribeiro Duarte Guedes

Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em  
populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*  
de Pernambuco

RECIFE  
2012

DUSCHINKA RIBEIRO DUARTE GUEDES

**ANÁLISE DA COMPETÊNCIA VETORIAL PARA O VÍRUS DENGUE EM  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus* DE  
PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/MS para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

RECIFE  
2012

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

G294a Guedes, Duschinka Ribeiro Duarte.  
Análise da competência vetorial para o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco / Duschinka Ribeiro Duarte Guedes. - Recife: s. n., 2012.  
101 p. : ilus., tab., graf.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres.

1. Aedes - virologia. 2. Vírus da Dengue – isolamento e purificação. 3. Controle de Vetores. 4. Replicação viral. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Título.

---

CDU 616.92

DUSCHINKA RIBEIRO DUARTE GUEDES

**ANÁLISE DA COMPETÊNCIA VETORIAL PARA O VÍRUS DENGUE EM  
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus* DE  
PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/MS para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Aprovada em:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora:**

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)  
**CPqAM – FIOCRUZ**

---

Dra. Lêda Narcisa Régis (Titular Interno)  
**CPqAM – FIOCRUZ**

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Titular Interno)  
**CPqAM – FIOCRUZ**

---

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Titular Externo)  
**CPqRR – FIOCRUZ**

---

Dra. Marli Tenório Cordeiro (Titular Externo)

**Secretaria de Saúde do Estado de PE (Laboratório Central de Saúde Pública)**

Dedico este trabalho  
A Marcelo, meu esposo  
À minha mãe, Norma Duarte  
Aos meus avós queridos, Lucila e Raimundo

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres por todas as orientações e ensinamentos transmitidos ao longo desses dez anos de convívio. Agradeço pela confiança, pelo incentivo e pela contribuição no meu crescimento profissional.

À Dra. Marli Cordeiro, Dra. Leda Régis, ao Dr. Paulo Pimenta, ao Dr. Fábio Brayner, à Dra. Patrícia Moura e à Dra. Cláudia Fontes, pelas contribuições indispensáveis que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Dra. Leda Régis, ao Dr. Rafael Dhalia, à Dra. Cintia Rocha e à Dra. Rita Maia pelas contribuições na qualificação deste trabalho.

Ao Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do CPqAM pela disponibilização da infra-estrutura que foi indispensável para a realização deste trabalho.

À Dra. Marli Cordeiro do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, minha guru da virologia, pela valiosa contribuição neste e em outros trabalhos, pela força, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos meus amigos e colegas do LAVITE, em especial, Verônica, Andréa Rangel, Sabrina, Geórgia, Jefferson, Ana Maria, André, Amanda, Mayara, Kênia, Renato, Zé Valter, Clintiano e Diégina pela convivência, companheirismo, pela troca de experiências, protocolos e por permitirem que eu me sentisse “em casa”.

À Dra. Tereza Magalhães pelos ensinamentos e pelo treinamento nas técnicas de infecção artificial e PCR em tempo real.

Aos amigos e colegas do Departamento de Entomologia pelo agradável convívio. Em especial à Dra. Alice Varjal (Queridinha), à Dra. Cláudia Fontes, Danilo Carvalho e Éllyda cujas participações foram essenciais no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

À Danielle Moura, Mariana Marques, Amaranta, Kelly, Ana Lisa, Gabriel, Marília Cavalcanti, Fábio e Luiz pelos momentos de descontração e boas risadas.

À minha família pelo amor incondicional e pelo apoio. Aos meus avós Pai Raimundo e Mãe Cila, a minha gratidão. Aos meus pais Norma e Élvio por tudo que tem feito, pelos ensinamentos, respeito, paciência e, principalmente, por compreender a minha ausência em alguns momentos.

Ao meu esposo, Marcelo Paiva, cuja participação em minha vida foi fundamental em mais uma conquista e, principalmente, pela paciência, amor, cumplicidade, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao programa de pós-graduação em Saúde Pública pela oportunidade.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, pela infra-estrutura e financiamento que possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

GUEDES, Duschinka Ribeiro Duarte. **Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco.** 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

## RESUMO

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são considerados os principais vetores da dengue, doença que afeta mais de 100 países e atinge, a cada ano, mais de 50 milhões de pessoas. Para que uma espécie seja incriminada como vetor de uma doença, ela deve ser capaz de se infectar com um determinado patógeno via oral, resistir à replicação deste no seu interior e transmiti-lo a um hospedeiro susceptível. Esta habilidade é denominada competência vetorial. Os rápidos avanços da biologia molecular têm facilitado o surgimento de novas abordagens que podem ser utilizadas para avaliar quantitativamente alguns aspectos da competência vetorial. Neste sentido, a RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) tem sido amplamente usada em estudos sobre a interação vírus-vetor. O presente estudo visou avaliar o processo de infecção do vírus Dengue (DENV) em amostras de intestinos e glândulas salivares *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, através da quantificação de partículas virais de três sorotipos de DENV via PCR em tempo real. Os resultados mostraram que as três populações de *Ae. aegypti* (RecLab, Recife e Petrolina) analisadas no presente estudo foram suscetíveis à infecção com DENV-1, DENV-2 e DENV-3. De uma maneira geral, as populações de *Ae. aegypti* de campo (Recife e Petrolina) foram mais competentes para a infecção do que a colônia de laboratório (RecLab). Considerando a espécie *Ae. albopictus*, as duas populações (laboratório e campo) também foram suscetíveis à infecção com os três sorotipos, porém a colônia de laboratório foi mais suscetível à infecção do que a população de campo. Os dados obtidos no presente estudo indicam que diferenças na carga viral usada durante a alimentação artificial podem influenciar nas taxas de infecção do vírus no intestino, porém não influenciam a disseminação dos vírus para as glândulas salivares. Outro aspecto importante foi o curto período de incubação extrínseco (PIE) apresentado pelas duas espécies, exceto na população de *Ae. aegypti* de Petrolina, diferente do que é descrito na literatura. Este resultado tem uma grande importância epidemiológica, pois quanto menor o PIE, maior será o tempo que a espécie vai ser capaz de transmitir o vírus para um hospedeiro sadio, aumentando assim as chances de transmissão de dengue. Além disso, revela a necessidade da implementação de estratégias mais rápidas para bloquear a transmissão da doença. Estas informações serão necessárias para os estudos de avaliação de risco de transmissão da dengue.

**Palavras-chave:** *Aedes* sp., vírus da dengue, controle de vetores, replicação viral, Brasil.



GUEDES, Duschinka Ribeiro Duarte. **Analysis of vector competence for dengue viruses of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* natural populations from Pernambuco.** 2012. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

### ABSTRACT

*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are considered the main vectors of dengue, a disease that affects more than 100 countries with more than 50 million cases occurring annually. In general, to be incriminated as a vector, the species must be capable of becoming orally infected with a pathogen, to resist its replication inside the vectors and transmit it on to a susceptible host. This ability is known as vector competence. Rapid advances in molecular biology have facilitated the emergence of new approaches that can be used to quantitatively evaluate some aspects of vector competence. With this purpose, a quantitative RT-PCR (qRT-PCR) based assay has been widely used in studies on virus-vector interaction. This work aimed to evaluate the process of virus infection in the mosquito, by quantifying three serotypes of DENV in midguts and salivary glands samples from *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* by using real-time PCR. Results showed that all three *Ae. aegypti* populations (RecLab, Recife and Petrolina) analyzed in this study were susceptible to infection with DENV-1, DENV-2 and DENV-3. Overall, field caught *Ae. aegypti* (Recife and Petrolina) were more competent for infection than the laboratory colony (RecLab). Regarding to *Ae. albopictus*, the two populations (laboratory colony and field) were also susceptible to infection with the three serotypes, but the laboratory colony was more susceptible to infection than the field population. Data obtained in this study indicate that differences in viral titers during artificial blood meal can influence infection rate in midgut but do not influence the virus dissemination to salivary glands. Another important result was the short extrinsic incubation period (EIP) displayed by both species which was different from what is reported in previous studies, except in the *Ae. aegypti* population from Petrolina infected with DENV-3. This result has a great epidemiological importance, since the shorter the EIP, the longer mosquitoes will be able to transmit virus to a healthy host, thus increasing the chances for dengue transmission. Moreover, it shows the need for a faster implementation of strategies to block the transmission of the disease. The information will be critical for studies on risk assessment of dengue transmission.

**Keywords:** *Aedes* sp., dengue virus, vector control, viral replication, Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Dengue em Pernambuco: coeficiente de incidência de casos por 100.000 habitantes, por Mesorregião, no período de 1995-2006.	26
<b>Figura 2 -</b>	Fêmeas dos mosquitos do gênero <i>Aedes</i> .	28
<b>Figura 3 -</b>	Exemplos de criadouros natural e artificial dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .	28
<b>Figura 4 -</b>	Esquema representativo do ciclo evolutivo de <i>Aedes</i> sp.	29
<b>Figura 5 -</b>	Sítios de desenvolvimento do vírus dengue dentro do mosquito.	32
<b>Figura 6 -</b>	Diagrama geral das barreiras de infecção que um vírus pode encontrar ao infectar um mosquito.	33
<b>Figura 7 -</b>	Mapa da distribuição de casos de Dengue e Chikungunya notificados em 2008 e a sobreposição de áreas habitadas pela espécie <i>Aedes albopictus</i> .	35
<b>Figura 8 -</b>	Esquema da alimentação artificial via oral com vírus Dengue em populações de mosquitos.	41
<b>Figura 9 -</b>	Visualização em gel de agarose 1,5% de produtos de RT-PCR de DENV com os primers de Lanciotti <i>et al.</i> (1992) (poços 1 a 3) e NS5 de Kong <i>et al.</i> (2006) (poços 6-8).	48
<b>Figura 10-</b>	Curva de dissociação da RT-PCR quantitativa dos vírus dengue usando os primers NS5.	49
<b>Figura 11-</b>	Perfil do efeito citopático em células C6/36 infectadas com DENV visualizadas em microscópio óptico.	50
<b>Figura 12-</b>	Perfil de infecção por DENV1 em amostras de intestinos da colônia de laboratório de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.	53
<b>Figura 13-</b>	Perfil de infecção por DENV1 em amostras de glândulas salivares da colônia de laboratório de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.	53
<b>Figura 14-</b>	Perfil de infecção por DENV1 em amostras de intestinos das populações de <i>Ae. albopictus</i> de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	55
<b>Figura 15-</b>	Perfil de infecção por DENV1 em amostras de glândulas salivares das populações de <i>Ae. albopictus</i> de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	56

<b>Figura 16-</b>	Perfil de infecção por DENV2 em amostras de intestinos da colônia de laboratório de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.	57
<b>Figura 17-</b>	Perfil de infecção por DENV2 em amostras de glândulas salivares da colônia de laboratório de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.	58
<b>Figura 18-</b>	Perfil de infecção por DENV2 em amostras de intestinos das populações de <i>Ae. albopictus</i> de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	59
<b>Figura 19-</b>	Perfil de infecção por DENV2 em amostras de glândulas salivares das populações de <i>Ae. albopictus</i> de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	60
<b>Figura 20-</b>	Perfil de infecção por DENV3 em amostras de intestinos da colônia de laboratório de <i>Ae. albopictus</i> coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.	61
<b>Figura 21-</b>	Perfil de infecção por DENV3 em amostras de intestinos das populações de <i>Ae. albopictus</i> de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	62
<b>Figura 22-</b>	Perfil de infecção por DENV3 em amostras de glândulas salivares das populações de <i>Ae. albopictus</i> de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	63
<b>Figura 23-</b>	Perfil de infecção por DENV1 em amostras de intestinos das populações de <i>Ae. aegypti</i> de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	66
<b>Figura 24-</b>	Perfil de infecção por DENV1 em amostras de glândulas salivares da população de <i>Ae. aegypti</i> de campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.	67
<b>Figura 25-</b>	Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) por DENV2 em amostras de intestinos das populações de <i>Ae. aegypti</i> de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi).	68

- Figura 26-** Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10) de amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) infectados com DENV2 e coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). 68
- Figura 27-** Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) por DENV2 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). 69
- Figura 28-** Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10) de amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) infectados com DENV2 e coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). 69
- Figura 29-** Perfil de infecção por DENV2 em amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção. 70
- Figura 30-** Perfil de infecção por DENV2 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção. 71
- Figura 31-** Perfil de infecção por DENV3 em amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção. 72
- Figura 32-** Perfil de infecção por DENV3 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção. 73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Casos notificados de dengue e coeficiente de incidência de casos por 100.000 habitantes no Estado de Pernambuco, entre 1995 a 2006.	25
<b>Tabela 2-</b>	Parâmetros usados nas infecções de <i>Aedes albopictus</i> com DENV1, DENV2 e DENV3.	51
<b>Tabela 3-</b>	Taxas de infecção e disseminação de DENV nas populações de <i>Ae. albopictus</i> ao final do 21º dia pós-infecção.	52
<b>Tabela 4-</b>	Parâmetros usados nas infecções de <i>Aedes aegypti</i> com DENV1, DENV2 e DENV3.	64
<b>Tabela 5-</b>	Taxas de infecção e disseminação de DENV nas populações de <i>Ae. aegypti</i> ao final do 21º dia pós-infecção.	65

## LISTA DE SÍMBOLOS

- $\mu\text{l}$  → Microlitros ( $10^{-6}$  litros);
- AEC → 3-amino-9-etil-carbazol
- $\text{cm}^2$  → centímetros quadrados
- Ct → Cycle threshold
- DC → Dengue clássica;
- DENV (Dengue virus) → vírus Dengue;
- DENV1 (Dengue vírus 1) → vírus Dengue sorotipo 1;
- DENV2 (Dengue vírus 2) → vírus Dengue sorotipo 2;
- DENV3 (Dengue vírus 3) → vírus Dengue sorotipo 3;
- DENV4 (Dengue vírus 4) → vírus Dengue sorotipo 4;
- DNA → Ácido desoxirribonucléico;
- dpi → dias pós-infecção
- FFU (Focus-Forming Unit) → Unidade formadora de foco;
- FHD → Febre hemorrágica da dengue
- L1 → Larva de primeiro estágio;
- L2 → Larva de segundo estágio;
- L3 → Larva de terceiro estágio;
- L4 → Larva de quarto estágio;
- MEB (Midgut Escape Barrier) → Barreira de escape do intestino;
- MIB (Midgut Infection Barrier) → Barreira de infecção do intestino;
- MIR (Minimum Infection Rate) → Taxa de infecção mínima;
- ml → Mililitros ( $10^{-3}$  litros)
- MOI (Multiplicity of infection) → Multiplicidade de infecção
- ng → nanogramas ( $10^{-9}$  gramas)
- NPT → Núcleo de Plataforma Tecnológica

- NS5 (Non-structural protein 5) → Proteína não estrutural 5
- ° C → graus Celsius
- OMS → Organização Mundial de Saúde;
- pb → pares de bases;
- PBS (Phosphate Buffered Saline) → Tampão fosfato-salino
- PFU (Plaque-Forming Unit) → Unidade formadora de placa;
- PIE → Período de incubação extrínseco;
- qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) → Reação em cadeia da polimerase quantitativa;
- qRT-PCR (quantitative Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction) → Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa quantitativa;
- RNA → Ácido ribonucleico;
- RNAi → RNA de interferência
- rpm → Rotações por minuto
- SCD → Síndrome de choque da dengue
- TCID50 → Median tissue culture infective dose
- U → unidades.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	20
<b>3 PERGUNTA CONDUTORA</b>	21
<b>4 OBJETIVOS</b>	22
<b>4.1 Geral</b>	22
<b>4.2 Específicos</b>	22
<b>5 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b>	23
<b>5.1 Dengue como problema de Saúde Pública</b>	23
<b>5.2 Os Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (Linneaus, 1972) e <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894)</b>	26
<b>5.3 Interação arbovírus-mosquitos</b>	29
<b>5.4 Competência Vetorial</b>	31
<b>6 METODOLOGIA</b>	37
<b>6.1 Coleta dos mosquitos</b>	37
<b>6.2 Preparação dos estoques de vírus em células C6/36</b>	37
<b>6.3 Propagação de vírus Dengue em células C6/36</b>	38
<b>6.4 Titulação por peroxidase</b>	39
<b>6.5 Infecção oral dos mosquitos com DENV</b>	40
<b>6.6 Dissecção dos mosquitos e extração de RNA total</b>	41
<b>6.7 Reações de RT-PCR convencional com primers NS5</b>	42
<b>6.8 Síntese dos padrões de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 usados na RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)</b>	43
<b>6.9 RT-PCR quantitativa com primers NS5 (qRT-PCR)</b>	44



<b>6.10 Detecção da taxa de infecção natural em amostras de <i>Ae.aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i></b>	45
<b>6.11 Considerações éticas</b>	47
<b>7 RESULTADOS</b>	48
<b>7.1 Ensaio de funcionalidade dos <i>primers</i> NS5 para RT-PCR convencional e RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)</b>	48
<b>7.2 Infecção de células C6/36 pelos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3</b>	49
<b>7.3 Replicação e tropismo de DENV em populações de <i>Ae. albopictus</i></b>	50
7.3.1 Replicação e tropismo de DENV-1 em intestino e glândula salivar de populações de <i>Ae. albopictus</i>	52
7.3.2 Replicação e tropismo de DENV-2 em intestino e glândula salivar de populações de <i>Ae. albopictus</i>	56
7.3.3 Replicação e tropismo de DENV-3 em intestino e glândula salivar de populações de <i>Ae. albopictus</i>	60
<b>7.4 Replicação e tropismo de DENV em populações de <i>Ae. aegypti</i></b>	63
7.4.1 Replicação e tropismo de DENV-1 em intestino e glândula salivar de populações de <i>Ae. aegypti</i>	65
7.4.2 Replicação e tropismo de DENV-2 em intestino e glândula salivar de populações de <i>Ae. aegypti</i>	67
7.4.3 Replicação e tropismo de DENV-3 em intestino e glândula salivar de populações de <i>Ae. aegypti</i>	71
<b>7.5 Detecção da taxa de infecção natural em amostras de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i></b>	73
<b>8 DISCUSSÃO</b>	75

<b>9 CONCLUSÕES</b>	83
<b>REFERÊNCIAS</b>	84
<b>APÊNDICE A – Artigo “Patient-based dengue virus surveillance in <i>Aedes aegypti</i> from Recife, Brazil.”</b>	92

## 1 INTRODUÇÃO

A família Culicidae contém espécies reconhecidas mundialmente como os principais vetores de doenças tais como malária, filariose linfática e dengue. Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são considerados os principais vetores da dengue, doença que afeta mais de 100 países e atinge, a cada ano, mais de 50 milhões de pessoas (GUBLER, 2006). Para que uma espécie seja incriminada como vetor de um agente etiológico, ela deve ser capaz de se infectar com um determinado patógeno via oral, resistir à replicação deste no seu interior e transmiti-lo a um hospedeiro susceptível. Para que um mosquito seja capaz de transmitir os quatro sorotipos do vírus dengue (DENV), ele deve primeiro, permitir a infecção do vírus em células epiteliais do intestino, a replicação e a disseminação deste para a hemocele e, finalmente infectar as glândulas salivares (BEERNTSEN *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2007). Esta habilidade intrínseca é denominada competência vetorial. O período que compreende desde a infecção oral até a disseminação do vírus nas glândulas salivares é conhecido como período de incubação extrínseco (PIE). Este período depende tanto de fatores ambientais como temperatura e umidade, bem como de fatores intrínsecos como competência vetorial e dose infectante (BLACK *et al.*, 2002; HALSTEAD, 2007). Além disso, a competência vetorial para arbovírus é associada a algumas barreiras anatômicas dos mosquitos que dificultam a infecção no vetor. Estas incluem: a barreira de infecção do intestino (Midgut Infection Barrier - MIB), a barreira de escape do intestino (Midgut Escape Barrier - MEB) e a barreira das glândulas salivares (HIGGS; BEATY, 2005). Sabe-se que pelo menos dois genes estão envolvidos na competência vetorial de *Ae. aegypti* ao DENV, um controlando a MIB e o outro a MEB (BEERNTSEN *et al.*, 2000). O conhecimento dos genes que controlam a competência vetorial, associado aos fatores que interferem na capacidade vetorial das populações de insetos poderá levar ao desenvolvimento de novas tecnologias para o controle das doenças transmitidas por vetores.

A maioria dos estudos sobre competência vetorial para o DENV era tipicamente qualitativo, detectando a presença ou não do vírus em algumas partes dos mosquitos como cabeça, intestino e glândulas salivares através de ensaios de imunofluorescência indireta (BENNETT *et al.*, 2002; LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; VAZEILLE *et al.*, 2003). No entanto, os avanços da biologia molecular têm favorecido o desenvolvimento de novas abordagens que podem ser empregadas na avaliação quantitativa de alguns aspectos da competência vetorial. A PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) tem sido amplamente usada em estudos sobre a interação vírus-vetor. Por ser uma técnica quantitativa bastante sensível, vem sendo empregada especialmente em estudos sobre competência

vetorial de mosquitos a diversos patógenos de importância médica (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2003; BAE *et al.*, 2003; KEMPF *et al.*, 2006; RICHARDSON *et al.*, 2006; SALAZAR *et al.*, 2007; VANLANDINGHAM *et al.*, 2004).

Os estudos sobre competência vetorial relacionados à cinética da replicação e tropismo do DENV nas populações de *Aedes* sp. são importantes, pois podem contribuir para uma melhor compreensão do potencial de transmissão e da interação vírus-vetor, fatores que condicionam a epidemiologia da dengue em uma determinada localidade. Apesar disso, não existem estudos que demonstrem com precisão, durante o PIE, a quantidade de vírus circulante em mosquitos provenientes de populações naturais infectados com DENV isolados da mesma localidade. Sendo assim, o presente estudo visou monitorar os sorotipos de DENV circulantes na população vetora, além de avaliar a competência vetorial para três sorotipos de DENV em amostras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, infectados artificialmente por via oral, coletadas em áreas endêmicas da Região Metropolitana do Recife e do município de Petrolina.

## 2 JUSTIFICATIVA

A dengue é uma doença que continua acometendo milhares de pessoas em todo o mundo, apesar de todos os esforços feitos para combatê-la. Atualmente, as pesquisas desenvolvidas para o controle dos vetores responsáveis pela transmissão de DENV visam, entre outras alternativas, o desenvolvimento de insetos transgênicos, refratários ao desenvolvimento e/ou transmissão do vírus. Este tipo de abordagem requer amplo conhecimento do processo de interação do vírus com o seu vetor, bem como uma maior compreensão sobre a natureza das variações nos níveis de competência vetorial exibidas pelas diferentes populações. Os dados gerados a partir deste trabalho produziram informações valiosas que podem subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias de controle e compreender melhor a epidemiologia da doença.

No estado de Pernambuco, com a introdução do DENV-4 em 2010, os quatro sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) circulam concomitantemente, podendo contribuir para a incidência de casos graves da doença. Outro fator relevante é que, além da presença de *Ae. aegypti*, pode-se encontrar nos bairros da Região Metropolitana do Recife, a espécie *Ae. albopictus*, que embora não seja incriminada como vetor de dengue no Brasil, a presença desta espécie não deve ser negligenciada.

Considerando a atual situação endêmica do DENV no país e baseado nos dados descritos acima, é de grande interesse analisar a competência vetorial das diferentes populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* a três dos quatro sorotipos que circulam na Região Metropolitana do Recife e Petrolina.

### **3 PERGUNTA CONDUTORA**

Existem variações entre populações das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* quanto à suscetibilidade à infecção por diferentes sorotipos do vírus Dengue?

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Conhecer e comparar a competência vetorial de populações de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*, estabelecidas em diferentes áreas da Região Metropolitana do Recife e do município de Petrolina, a três sorotipos do vírus Dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-3).

### 4.2 Específicos

- a) Estimar a suscetibilidade à infecção por via oral a três sorotipos do DENV em populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes da Região Metropolitana do Recife e Petrolina;
- b) Conhecer o efeito de diferentes cargas virais inoculadas via alimentação artificial sobre a eficiência da infecção;
- c) Identificar a presença e quantificar o número de partículas virais de três sorotipos de DENV em diferentes órgãos e intervalos de tempo, durante o período de incubação extrínseco, nas populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*;
- d) Estimar a taxa de infecção natural em populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* do Recife.

## 5 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 5.1 Dengue como problema de Saúde Pública

A dengue afeta mais de 100 países nas regiões tropicais e subtropicais do mundo incluindo países da África, Sudeste Asiático, Pacífico e Américas (DEROUCHE *et al.*, 2003), sendo, portanto considerada uma das mais importantes arboviroses na atualidade. O vírus dengue (DENV) é um vírus de RNA com polaridade positiva, pertencente ao gênero *Flavivirus*, Família *Flaviviridae*, constituído por quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) e dentro de cada sorotipo existem diferentes linhagens ou genótipos (HENCHAL; PUTNAK, 1990). A infecção com um sorotipo confere imunidade apenas àquele sorotipo com o qual o indivíduo foi infectado (GUBLER, 1998). A doença pode variar desde a forma assintomática até as formas mais graves, como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome de choque da dengue (SCD). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que, a cada ano, a dengue acomete mais de 50 milhões de pessoas e, atualmente, 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000). O crescimento urbano desordenado, o aumento do tráfego aéreo que contribui para a dispersão do mosquito, a falta de medidas eficientes de controle do vetor e a falta de engajamento da população na luta contra o mosquito são alguns fatores que contribuem para a disseminação da doença (GUBLER, 1998; GUBLER; CLARK, 1995; KOH *et al.*, 2008).

A situação da dengue nas Américas é uma das mais preocupantes no cenário da saúde pública mundial. Nas Américas, o DENV circulou desde o século XIX, período em que coincidiu com a intensificação do transporte comercial entre os portos da região do Caribe e do sul dos Estados Unidos com outras regiões do mundo, até as primeiras décadas do século XX. Após a década de 60, ocorreu a reintrodução dos sorotipos 2 e 3 associada à ocorrência de vários casos de dengue clássica (DC). No entanto, o evento epidemiológico mais importante na história da dengue nas Américas foi a epidemia de febre hemorrágica da dengue e a síndrome de choque da dengue (FHD/SCD) em Cuba no ano de 1981, quando foram notificados mais de 300.000 casos (TEIXEIRA *et al.*, 1999). Atualmente, os quatro sorotipos do vírus circulam em vários países da América do Sul e Central, e o Brasil foi responsável por quase 80% dos casos de dengue nas Américas ocorridos nas últimas décadas do século XX (SCHATZMAYR, 2000). No século XXI, o Brasil se tornou o país com o



maior número de casos de dengue, mais de três milhões de casos entre os anos de 2000 a 2005, que representa 61% de todos os casos notificados pela Organização Mundial de Saúde. Nos anos de 2002 e 2004, a incidência de dengue no Brasil variou de 446 a 63 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (TEIXEIRA; BARRETO, 2009).

No Brasil, o primeiro caso de dengue confirmado em laboratório ocorreu em 1982 na região norte do país (Boa Vista, no Estado de Roraima), com o isolamento do DENV-1 e DENV-4. Em 1986, foi identificada a introdução do DENV-1 inicialmente no Estado do Rio de Janeiro que resultou em uma rápida disseminação do vírus pelo país resultando em epidemias em diversos estados. Em 1990, com a chegada do sorotipo 2, também no Rio de Janeiro, a situação se agravou devido ao aparecimento dos primeiros casos de dengue hemorrágica associados à infecção secundária ou seqüencial. No final do ano 2000, mais uma vez no Rio de Janeiro, foi confirmada a introdução do DENV-3, responsável em 2002 por epidemias de grande magnitude naquele estado e em outros estados brasileiros. Na epidemia de 2002, a região nordeste registrou a maior taxa de incidência regional, com 617 casos por 100 mil habitantes, sendo o Estado de Pernambuco, o que apresentou o maior número absoluto de casos, 120.316, e a maior taxa de incidência, 1.438 por 100 mil habitantes (CORDEIRO *et al.*, 2008; SOUZA 2007).

No Estado de Pernambuco, o primeiro surto de dengue ocorreu em 1987 com 2.118 casos notificados, no entanto, após terem sido tomadas medidas destinadas ao controle do vetor, a situação permaneceu controlada até 1995 quando a introdução do DENV-2 favoreceu a ocorrência de uma nova epidemia. Em 2002, a epidemia causada pelo DENV-3 apresentou o mais alto coeficiente de incidência da história. No ano seguinte, o coeficiente de incidência caiu para 320 casos por 100 mil habitantes, provavelmente pela redução dos hospedeiros suscetíveis à doença. Nos três anos seguintes, 2004 a 2006, também houve redução no número de casos, sendo os coeficientes de incidência de 77, 154 e 219/100 mil habitantes, respectivamente. De 1995 a 2006 foram notificados no estado de Pernambuco aproximadamente 380.000 casos de dengue (Tabela 1) (CORDEIRO *et al.*, 2008). Embora o coeficiente de incidência tenha caído no período de 2004-2006 (Figura 1), um estudo sobre o monitoramento de DENV nas populações de *Ae. aegypti* do Estado de Pernambuco mostrou que ocorre a circulação de três sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) na população vetora, aumentando a chance de ocorrência de novas epidemias (GUEDES *et al.*, 2010). Além disso, é importante destacar que a existência de DENV-4 em países da América do Sul como a Venezuela (URDANETA *et al.*, 2005) e a reintrodução deste sorotipo na região norte do Brasil em 2010 (TEMPORAO *et al.*, 2011) pode favorecer o aparecimento das formas mais graves da doença.

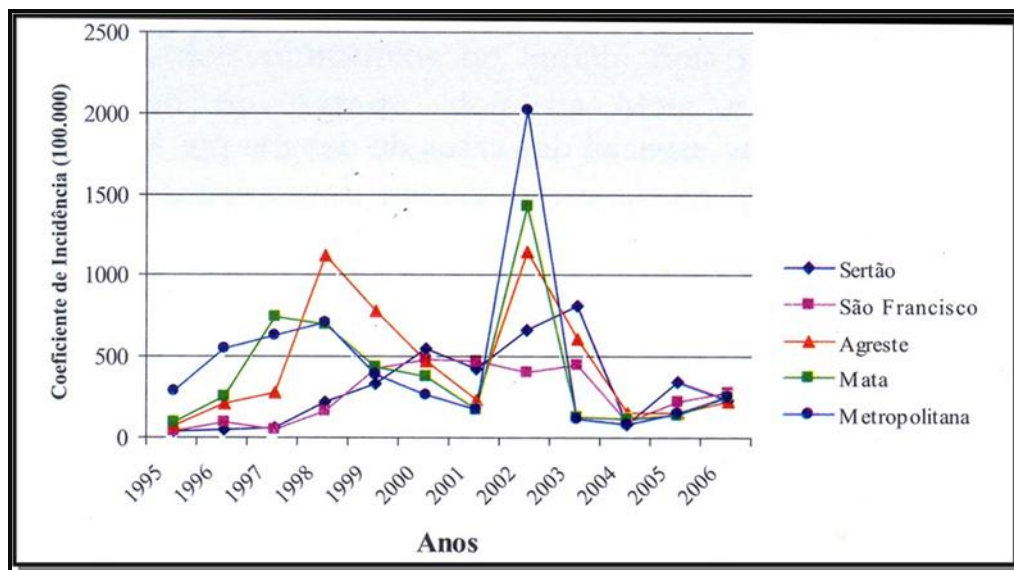
A co-circulação de mais de um sorotipo na população de mosquito, o aumento da população humana suscetível ao vírus e o aumento da densidade populacional dos vetores responsáveis pela transmissão do vírus são fatores que podem favorecer o risco de ocorrerem mais epidemias com aumento no número de casos de dengue hemorrágica. Apesar dos inúmeros esforços para se desenvolver uma vacina que seja capaz de imunizar toda a população aos quatro sorotipos da dengue, ainda não existe uma vacina disponível comercialmente. Sendo assim, a prevenção desta doença ainda é feita primariamente através do controle dos vetores responsáveis pela transmissão do vírus.

**Tabela 1** - Casos notificados de dengue e coeficiente de incidência de casos por 100.000 habitantes no Estado de Pernambuco, entre 1995 a 2006.

Ano	Número de casos notificados			Coeficiente de Incidência (100.000 habitantes)
	Total	1º Semestre	2º Semestre	
1995	9.982	8.300	1.682	134
1996	22.722	18.884	3.838	307
1997	32.267	28.307	4.320	437
1998	52.633	44.563	8.070	699
1999	35.099	25.597	9.502	463
2000	27.949	24.801	3.148	353
2001	17.112	11.448	5.664	214
2002	116.245	111.825	4.420	1.438
2003	26.083	23.221	2.852	320
2004	6.337	4.686	1.651	77
2005	12.990	8.223	4.767	154
2006	18.595	12.920	5.675	219
Total	378.374	322.775	55.589	

**Fonte:** Cordeiro *et al.* (2008).

**Figura 1** - Dengue em Pernambuco: coeficiente de incidência de casos por 100.000 habitantes, por Mesorregião, no período de 1995-2006.



Fonte: Cordeiro *et al.* (2008).

## 5.2 Os Mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)

A família Culicidae representa um dos maiores grupos de artrópodes de importância médica e veterinária, e é dividida em três principais subfamílias: Anophelinae, Toxorhynchitinae e Culicinae. No mundo existem mais de 3.500 espécies e subespécies de mosquitos que podem ser encontradas em locais onde exista água parada, condição necessária ao desenvolvimento de seus estágios imaturos. Podem ser encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártida. Os adultos são alados e se alimentam de seivas de flores e frutos como fonte de carboidratos, necessários para o metabolismo energético dos adultos. Ainda assim, com exceção da subfamília Toxorhynchitinae, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para maturação dos ovos. Este hábito de hematofagia confere a importância destes mosquitos como vetores de doenças. Dentre os patógenos transmitidos pela família Culicidae destacam-se o *Plasmodium*, os vírus da febre amarela e da dengue (CONSOLI; LOURENCO DE OLIVEIRA, 1994; HIGGS; BEATY, 2005).

Considerado como o principal vetor da dengue, o mosquito *Ae. aegypti* (Figura 2A), foi introduzido no Brasil no período colonial, adaptando-se, portanto, com facilidade em áreas tropicais e subtropicais, principalmente, dentro de zonas isotermas de 20 °C (CONSOLI; LOURENCO DE OLIVEIRA, 1994). Na década de 30, o mosquito já ocupava uma área

considerável do Brasil. Em 1940, foi iniciada uma campanha de controle dos mosquitos em escala hemisférica para combater a febre amarela. Em 1955, não foram notificados casos de dengue e/ou febre amarela em território brasileiro e, por essa razão, o vetor foi considerado erradicado nesse mesmo ano. Devido a uma descontinuidade dos programas de controle, houve uma reinvasão de *Ae. aegypti* nos anos 70 (GUBLER, 1998) e, nos dias de hoje, é encontrado em todos os estados brasileiros, bem como na maioria dos países tropicais. Esta espécie apresenta hábitos alimentares diurnos e em virtude de sua relação estreita com o homem (antropofilia), o mosquito *Ae. aegypti* é considerado um mosquito urbano podendo ser encontrado em áreas domiciliares, onde é mais comum, e peridomiciliares.

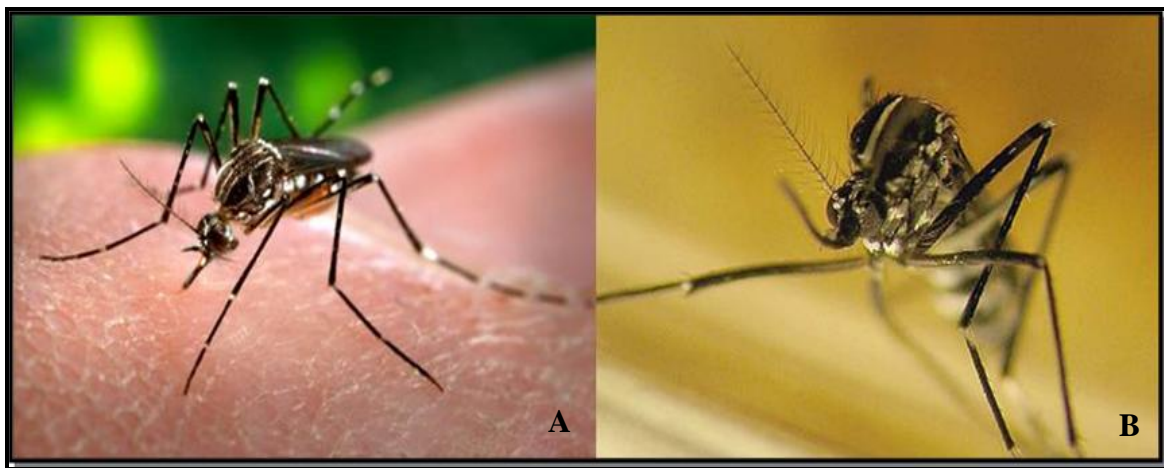
*Ae. albopictus* (Figura 2B), conhecido como “tigre asiático”, é um mosquito oriundo das florestas tropicais do sudeste asiático considerado mais silvestre do que *Ae. aegypti*. A forma adulta tem tórax enegrecido, freqüentemente ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateadas. O primeiro relato da presença deste mosquito no Brasil ocorreu em 1986 no Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986). Desde então, este mosquito se dispersou tão rapidamente que, atualmente, pode ser encontrado em quase todo o território nacional, com exceção dos estados do Amapá, Roraima, Acre, Piauí e Sergipe (BALESTRA *et al.*, 2008; GRATZ, 2004; MARTINS *et al.*, 2006). De hábito alimentar diurno, *Ae. albopictus* também pode ser encontrado no interior do domicílio como *Ae. aegypti*, porém é mais comum no peridomicílio onde se alimenta e faz a oviposição (LIMA-CAMARA *et al.*, 2006).

Em países de climas temperados, os ovos de *Aedes* sp. podem sobreviver por vários meses durante o inverno. Esta capacidade deve-se a um fenômeno denominado diapausa que é caracterizado pela suspensão de função e desenvolvimento desses ovos. Nos culicídeos, este fenômeno ocorre quando a larva de primeiro estágio já está formada. Esta característica está presente nas populações de clima temperado e ausente nas populações de clima tropical (BENEDICT *et al.*, 2007; PAUPY *et al.*, 2009). Os ovos com desenvolvimento completo passam pelo fenômeno chamado quiescência e, quando colocados em contato com a água, desencadeiam o processo de eclosão das larvas dando início ao ciclo de desenvolvimento (CONSOLI; LOURENCO DE OLIVEIRA, 1994; HAWLEY *et al.*, 1989).

Os ovos podem ser colocados pela fêmea dos mosquitos tanto em criadouros naturais (internódio de bambus, buracos em árvores, casca de frutas) quanto em criadouros artificiais. Os criadouros artificiais, por sua vez, podem ser tanto aqueles abandonados pelo homem a céu aberto quanto os de uso doméstico para armazenamento de água. Como exemplos de criadouros artificiais podemos citar: pneus, latas, caixas d’água, piscinas, etc (Figura 3).

Nesses criadouros, as fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável (CONSOLI; LOURENCO DE OLIVEIRA, 1994).

**Figura 2** - Fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*.



**Fonte:** Paupy *et al.* (2009).

**Legenda:** A) *Aedes aegypti* e B) *Aedes albopictus*

**Figura 3** - Exemplos de criadouros natural e artificial dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

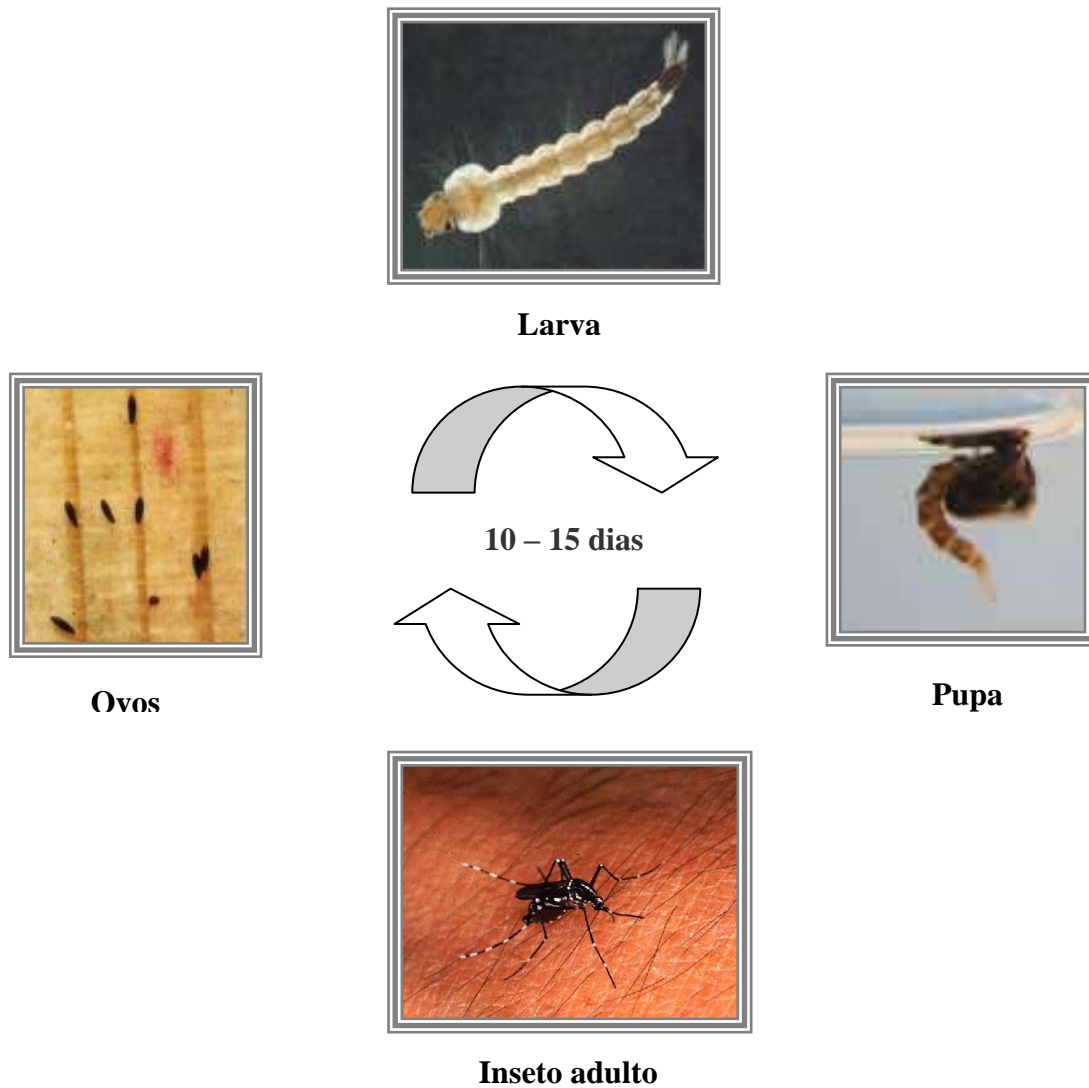


**Fonte:** Paupy *et al.* (2009).

O ciclo de desenvolvimento dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* compreende quatro estágios: ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Figura 4). O tempo de crescimento e o desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro. Este ciclo geralmente se completa em um curto espaço de tempo, aproximadamente 10 dias, contribuindo para o

aumento da densidade populacional desta espécie e a disseminação de patógenos (MARQUARDT, 2004).

**Figura 4** – Esquema representativo do ciclo evolutivo de *Aedes* sp.



**Fonte:** Adaptado pela autora.

### 5.3 Interação arbovírus-mosquitos

Uma grande variedade de patógenos é mantida na natureza por ciclos de transmissão que envolve o hospedeiro humano e um inseto hematófago. Geralmente, o patógeno exerce pouco ou nenhum efeito deletério sobre os insetos, no entanto, a infecção no hospedeiro humano pode resultar em altas taxas de morbidade e mortalidade. Dentre os patógenos que

são mantidos neste ciclo hospedeiro-vetor, podem-se destacar os arbovírus (Arthropod-borne viruses – vírus transmitidos por artrópodes), como Dengue, Febre amarela, Chikungunya, Encefalites eqüinas, dentre outros (HIGGS; BEATY, 2005). Os arbovírus são mantidos naturalmente por hospedeiros intermediários (artrópode hematófago) que o transmite para um hospedeiro vertebrado.

Os artrópodes podem ser infectados por diferentes mecanismos, como a ingestão de sangue contaminado do hospedeiro vertebrado (transmissão horizontal), transmissão vertical ou transovariana e transmissão venérea. A hematofagia ou o hábito de se alimentar de sangue é uma condição necessária de alguns artrópodes para a maturação dos ovos. Em relação às fontes de alimentação sangüínea, alguns mosquitos se alimentam preferencialmente em mamíferos, como os do gênero *Aedes* e *Anopheles*, outros buscam como fonte de alimentação sangüínea os mamíferos e aves, como as espécies do gênero *Culex*. No momento do repasto sangüíneo, se o hospedeiro vertebrado estiver infectado com um patógeno, ele poderá transmitir este patógeno para o inseto, dando início ao ciclo da transmissão biológica (KUNO; CHANG, 2005). Outro mecanismo de transmissão do patógeno para os mosquitos é a transmissão vertical ou transovariana (inseto – progênie). Neste mecanismo, as fêmeas de mosquitos infectadas transmitem, no caso das arboviroses, os vírus para a progênie. Embora este fenômeno ainda não esteja totalmente elucidado, vários autores demonstram a existência deste mecanismo de transmissão na natureza (CECILIO *et al.*, 2009; GARCIA-REJON *et al.*, 2008; GUEDES *et al.*, 2010; GUNTHER *et al.*, 2007; PESSANHA *et al.*, 2011; THENMOZHI *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de transmissão do patógeno para o inseto, porém menos comum, é a transmissão venérea. Na transmissão venérea, os mosquitos são infectados durante a cópula. Neste caso, um macho infectado via transmissão transovariana poderá ser capaz de transmitir o vírus para uma fêmea sadia. Uma vez infectadas, as fêmeas poderão transmitir o patógeno para um hospedeiro vertebrado sadio dando início assim ao ciclo de transmissão da doença (HIGGS; BEATY, 2005).

A compreensão da transmissão de uma doença não é baseada somente na interação entre o vetor, o hospedeiro vertebrado e o patógeno. Existem outros componentes, além desta interação, que podem afetar a transmissão das doenças transmitidas por vetores. Considerando os fatores relacionados ao vetor, parâmetros como abundância, taxa de sobrevivência, grau de domiciliação e comportamento alimentar, determinantes da frequência do contato do vetor com o hospedeiro, são importantes para a avaliação do risco de transmissão da doença, e do risco de ocorrência de epidemia. Além disso, o estudo de características intrínsecas do vetor

como a competência vetorial também é importante para determinar o papel individual de cada espécie vetora na transmissão das doenças (MARQUARDT, 2004).

#### 5.4 Competência Vetorial

A competência vetorial é a habilidade intrínseca de uma espécie para transmitir biologicamente um agente causador de doenças. No caso da competência vetorial de mosquitos para arbovírus, ela inclui a suscetibilidade à infecção, a duração do PIE e a eficiência na transmissão (BLACK *et al.*, 2002; BOSIO *et al.*, 1998; BOSIO *et al.*, 2000). Sendo assim, a competência vetorial para DENV pode ser estimada pela proporção de mosquitos que, tendo ingerido sangue com vírus, apresentam após um tempo de incubação infecção disseminada (presença de vírus ou antígenos virais em qualquer parte do corpo, exceto intestino). A taxa de disseminação corresponde à proporção de mosquitos com infecção disseminada pelo total de mosquitos que apresentaram intestinos positivos (CHRISTOFFERSON; MORES, 2011; RICHARDSON *et al.*, 2006; SALAZAR *et al.*, 2007).

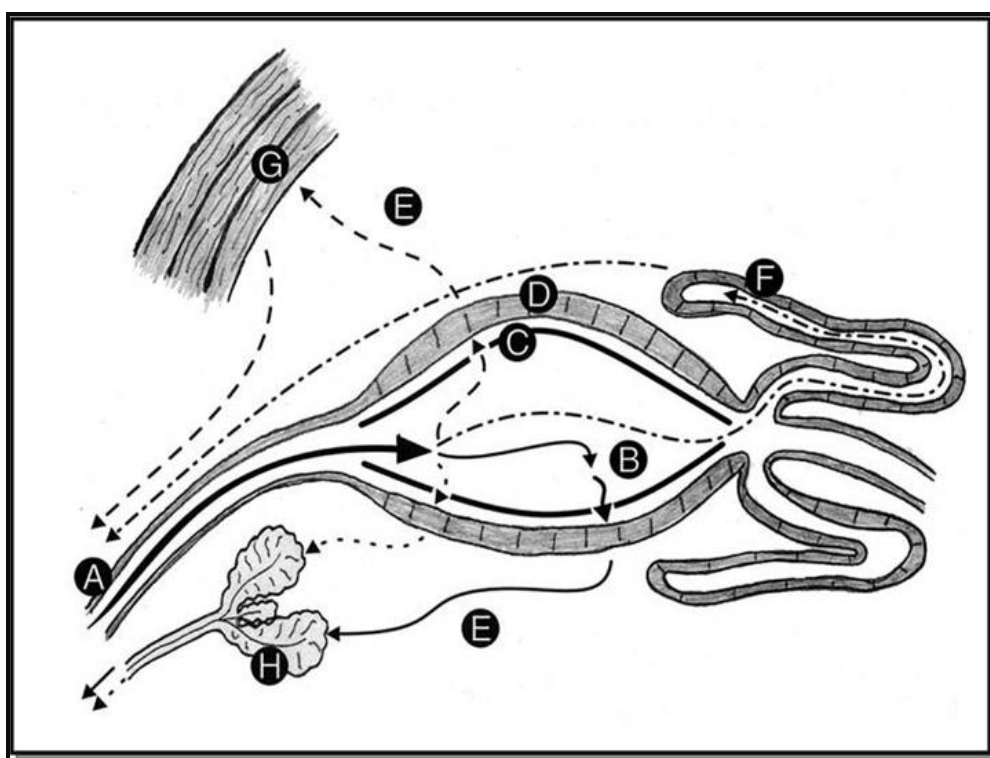
Na transmissão biológica, o PIE é o período que compreende desde a ingestão de um sangue contaminado até a capacidade de transmissão do patógeno presente na glândula salivar para um hospedeiro. Durante este período, o vírus infecta e se replica nas células do intestino e pode migrar, através da hemolinfa, para órgãos secundários. Se o vírus se disseminar até as glândulas salivares, infectando-as, este vírus pode ser transmitido para o hospedeiro durante o repasto sangüíneo (Figura 5). O período de incubação pode variar de acordo com a temperatura do ambiente; quanto maior a temperatura, menor o PIE (BLACK *et al.*, 2002; HIGGS; BEATY, 2005). Em mosquitos, o PIE pode variar de 8 a 14 dias para infecção com os vírus da Família *Flaviviridae* (Dengue e Febre Amarela) ou de 4 a 10 dias para infecção com o vírus Chikungunya (Família *Togaviridae*) (KNIPE; HOWLEY, 2007).

Barreiras próprias do inseto, capazes de impedir que o vírus se replique e dissemine para as glândulas salivares podem afetar consideravelmente a competência vetorial. Dentre essas barreiras se destacam: Barreira de infecção do intestino (Midgut Infection Barrier – MIB), barreira de escape do intestino (Midgut Escape Barrier - MEB) e a barreira de transmissão ou barreira de infecção das glândulas salivares (Figura 6). Na espécie de inseto que apresenta MIB, o vírus não consegue infectar as células do intestino. Se uma espécie de inseto não tem MIB, porém tem a MEB, o vírus se replica, infecta as células do intestino, porém ele não consegue sair dessas células e, portanto, não se dissemina para a hemolinfa, o



que permitiria a sua migração para órgãos secundários. Existem espécies de insetos que podem ter a barreira de infecção das glândulas salivares. Nessas espécies, o vírus, por não apresentar tropismo pelas células destes órgãos, não infectam as glândulas salivares. Uma vez que as glândulas salivares não estão contaminadas com o vírus, o mosquito não poderá transmiti-lo ao hospedeiro no momento do repasto sanguíneo (BLACK *et al.*, 2002; BOSIO *et al.*, 1998; BOSIO *et al.*, 2000). Essas barreiras de infecção para o vírus dengue foram estudadas anteriormente em populações de *Ae. aegypti* coletadas no México, Estados Unidos e Senegal (BENNETT *et al.*, 2005; SALAZAR *et al.*, 2007; SYLLA *et al.*, 2009).

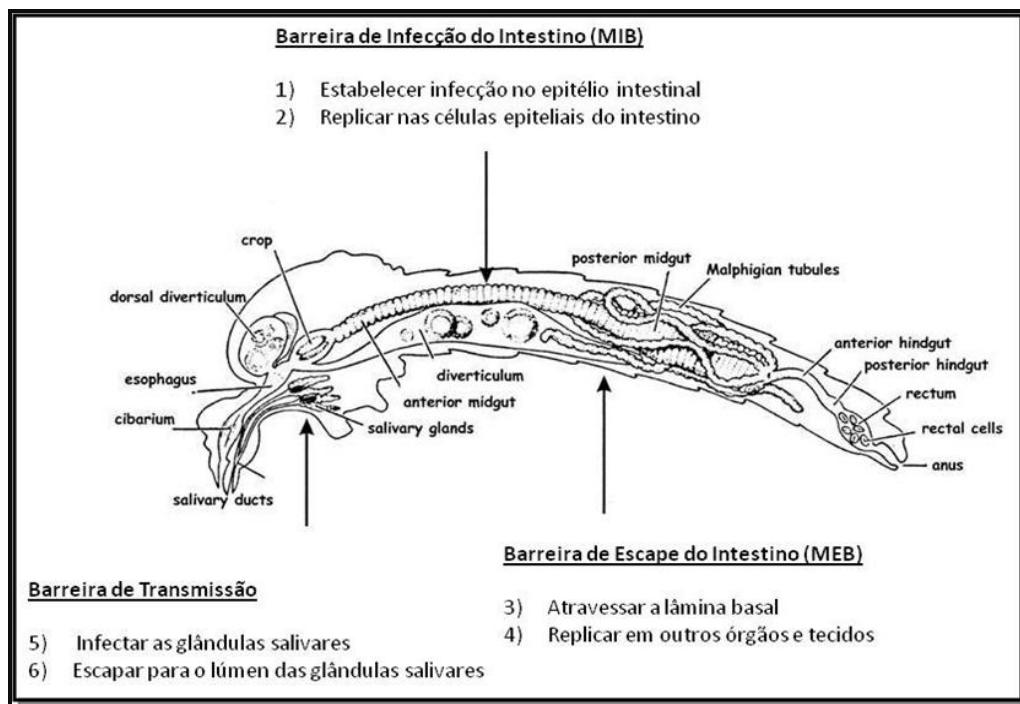
**Figura 5** - Sítios de desenvolvimento do vírus dengue dentro do mosquito.



**Fonte:** Beerntsen *et al.* (2002).

**Legenda:** A) Local de ingestão do sangue contaminado; B) Intestino; C) Matriz peritrófica; D) Células epiteliais do intestino; E) Hemolinfa; F) Túbulos de Malpighi; G) Musculatura torácica e H) Glândulas salivares.

**Figura 6** - Diagrama geral das barreiras de infecção que um vírus pode encontrar ao infectar um mosquito.



Fonte: Black IV *et al.* (2002).

Outros fatores extrínsecos que podem interferir na competência vetorial de uma espécie a um patógeno são: o título do vírus no sangue e a competição interespecífica na fase larval do inseto. Pesko *et al.* (2009) avaliaram a suscetibilidade dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes da Flórida ao vírus Chikungunya utilizando na infecção diferentes títulos virais. Os autores demonstraram que com altas doses do vírus ( $10^{5,2}$  e  $10^{6,1}$  PFU/ml), ambas as espécies foram suscetíveis à infecção viral. Quando os mosquitos foram infectados com baixas doses do vírus ( $10^{3,6}$  e  $10^{4,4}$  PFU/ml), apenas a espécie *Ae. albopictus* foi suscetível à infecção com o Chikungunya. Diallo *et al.* (2008) avaliaram a competência vetorial de populações de *Ae. aegypti* do Senegal para dois isolados de DENV-2, sendo um deles uma cepa silvestre, e mostraram que a diferença nas taxas de disseminação poderia ser decorrente do título viral usado nos diferentes experimentos. A competição existente entre as larvas do mosquito pode influenciar algumas características do inseto adulto, podendo, desta forma afetar a competência vetorial. Alto *et al.* (2008) analisaram o efeito da competição entre larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na suscetibilidade à infecção pelo DENV-2. A ocorrência de competição interespecífica aumentou a suscetibilidade de *Ae. albopictus* à infecção com dengue e aumentou, conseqüentemente, o potencial de disseminação do vírus. Os autores sugeriram que a competição parece resultar em uma diminuição das barreiras morfológicas e fisiológicas dos mosquitos à infecção viral.

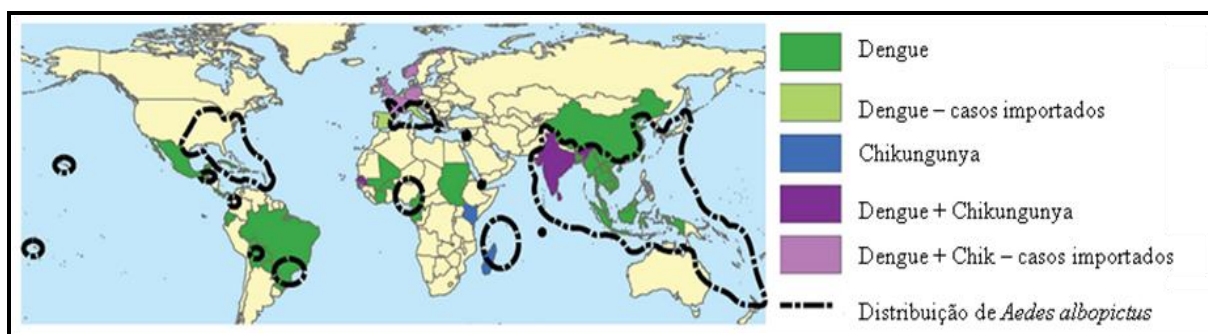
Embora muitas espécies de artrópodes sejam capazes de transmitir um determinado patógeno, somente aquelas capazes de manter todo o ciclo do agente patogênico em seus tecidos e células são consideradas os vetores biológicos primários. Segundo Mitchell (1995), para que uma espécie seja considerada vetor biológico de um determinado arbovírus devem ser considerados quatro critérios: 1) o isolamento do vírus em estudo em espécimes coletados diretamente na natureza; 2) demonstração que o mosquito se infectou após uma alimentação artificial utilizando o sangue de um hospedeiro na fase de viremia ou uma suspensão de vírus; 3) demonstração de que o vírus pode ser transmitido para um hospedeiro através de uma picada, ou detecção comprovada do vírus nas glândulas salivares da espécie e 4) evidências em campo confirmando uma associação entre a espécie de mosquito estudada e a população de vertebrados na qual a infecção viral esteja ocorrendo.

Existem outros fatores que podem favorecer a transmissão de um vírus por um inseto, além da competência vetorial. O vetor deve habitar o mesmo ambiente do hospedeiro vertebrado para permitir um maior contato entre as espécies, favorecendo a transmissão. Outro fator importante é a longevidade da espécie vetora. Quanto mais tempo a espécie vetora sobreviver, maior será o número de vezes que ela vai se alimentar de sangue, aumentando assim o contato vetor-hospedeiro e, conseqüentemente, a capacidade de transmissão. Para ser capaz de transmitir, é necessário que a longevidade do vetor seja superior ao período que o vírus leva para completar seu ciclo, desde a ingestão pelo inseto até a invasão da luz das glândulas salivares. Uma vez os mosquitos infectados com DENV, eles serão capazes de carregar o vírus por toda a sua vida. Alguns estudos demonstraram que a competência vetorial pode variar tanto entre espécies diferentes como entre diferentes populações da mesma espécie. Populações de *Ae. aegypti*, estudadas em diferentes locais variam quanto à competência em transmitir o DENV (BENNETT *et al.*, 2002; DIALLO *et al.*, 2008; LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; SYLLA *et al.*, 2009).

Embora *Ae. albopictus* ainda não seja incriminado como vetor da dengue no Brasil, estudos em laboratório demonstram que a espécie é capaz de transmitir pelo menos 26 arboviroses, dentre as mais importantes podemos citar os quatro sorotipos de Dengue, Febre amarela, Chikungunya, Ross river e o vírus do Oeste do Nilo (GRATZ, 2004; PAUPY *et al.*, 2009). Na natureza, esta espécie tem sido incriminada como principal vetor de dengue nas epidemias ocorridas no Japão, Indonésia, Seychelles, Tailândia, Malásia (HAWLEY, 1988), no Havaí (EFFLER *et al.*, 2005), Gabão (PAUPY *et al.*, 2010) e mais recentemente na Europa (FIELD *et al.*, 2010; LA RUCHE *et al.*, 2010; WYMANN *et al.*, 2008). Além disso, *Ae. albopictus* tem sido responsável pelo número crescente de pessoas acometidas pelo vírus Chikungunya na Europa, África e Oceano Índico (BONILAURI *et al.*, 2008; PAGES *et al.*,

2009; REITER *et al.*, 2006) (Figura 7). Por esta razão, esta espécie tem sido incluída em estudos sobre competência vetorial para arboviroses de importância médica e sanitária (FERNANDEZ *et al.*, 2003; GIROD *et al.*, 2011; GUEDES, 2006; LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; MILLER; BALLINGER, 1988; MOUTAILLER *et al.*, 2009; PAUPY *et al.*, 2001; PESKO *et al.*, 2009; TALBALAGHI *et al.*, 2010; VAN DEN HURK *et al.*, 2009).

**Figura 7** – Mapa da distribuição de casos de Dengue e Chikungunya notificados em 2008 e a sobreposição de áreas habitadas pela espécie *Aedes albopictus*.



Fonte: Field *et al.* (2010).

A competência vetorial de uma espécie a um determinado patógeno pode ser estudada por várias técnicas. As técnicas anteriormente utilizadas traziam resultados tipicamente qualitativos, pois detectavam presença ou ausência do antígeno viral em diferentes partes do mosquito após um período de 14 dias. A competência em um grupo experimental era estimada pela proporção de mosquitos testados que desenvolveram infecção, caracterizada pela presença do antígeno na cabeça do mosquito através da técnica de imunofluorescência (BENNETT *et al.*, 2002; BOSIO *et al.*, 1998; LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; VAZEILLE *et al.*, 2001). Para avaliar quantitativamente a competência vetorial, a técnica mais utilizada era a titulação por plaqueamento (MORENS *et al.*, 1985). No entanto, alguns fatores são importantes para o sucesso do ensaio, como o fenótipo e o número de passagens do vírus, além do tipo e quantidade de célula usada no ensaio, pois nem todos os fenótipos de DENV são capazes de formar placas, condição necessária para quantificação das amostras nesse ensaio. Além disso, o tempo que demanda para a realização total do ensaio é de sete dias, sendo inviável quando há a necessidade de quantificar um elevado número de amostras.

Os rápidos avanços na biologia molecular têm facilitado o desenvolvimento de novas técnicas para avaliar aspectos da competência vetorial nas espécies de mosquitos. A técnica de RT-PCR em tempo real ou RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) tem proporcionado a

sensibilidade, rapidez e o poder estatístico necessários aos experimentos. As principais vantagens deste sistema são: a) redução do tempo necessário à realização do teste, b) baixo risco de contaminação com o produto amplificado e c) quantificação da carga viral por comparação com uma curva padrão. A quantificação da carga viral pode ser realizada por duas estratégias: o uso de SYBR Green, substância fluorescente que se liga à molécula de DNA, ou das sondas marcadas, como o TaqMan. Embora as estratégias que utilizam sondas marcadas sejam mais sensíveis e específicas que o SYBR Green, elas são mais caras. Mesmo assim, a técnica utilizando o SYBR Green para estudos com arbovírus tem trazido resultados satisfatórios (CHIEN *et al.*, 2006; LAI *et al.*, 2007; SALAZAR *et al.*, 2007; SHU *et al.*, 2003). Embora existam muitos estudos que avaliam a competência vetorial utilizando a qRT-PCR, os autores reforçam a importância do estudo da cinética da replicação e tropismo do vírus em mosquitos, podendo proporcionar um melhor conhecimento do potencial de transmissão e da interação vírus-vetor que condiciona a epidemiologia de dengue local e o seu potencial endêmico.

## 6 METODOLOGIA

### 6.1 Coleta dos mosquitos

No presente estudo foram utilizadas três populações de *Ae. aegypti*: duas de campo (Recife - 08°03'14''S 34°52'51''O e Petrolina - 09°23'55''S 40°30'03''O) e uma colônia mantida em laboratório (RecLab). Em relação à espécie *Ae. albopictus*, foram usadas duas populações: uma de laboratório e uma população de campo proveniente da Região Metropolitana do Recife. As amostras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram coletadas sob a forma de ovos através de armadilhas de oviposição (ovitrampas), adaptadas do modelo original de Fay e Perry (1965) e descritas em Regis *et al.* (2008). Os ovos coletados em campo foram levados ao insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) para fundar as populações, que foram mantidas sob condições padrão de laboratório (temperatura, 26°C ± 1°C; umidade relativa do ar de 60 a 80% e fotoperíodo 12:12 h C/E) para obtenção dos adultos que foram utilizados nos experimentos. As infecções das populações de campo foram realizadas com mosquitos das gerações F1 e F2. Com relação às colônias de laboratório, a RecLab (*Ae. aegypti*) usada nos experimentos tem sido mantida no insetário há mais de 15 anos e se originou de amostras coletadas em Recife enquanto que a colônia de *Ae. albopictus* tem sido mantida há oito anos e é proveniente do município de Moreno (08°07'07''S 35°05'32''O) em Pernambuco. As infecções das populações de mosquitos com DENV foram realizadas por espécie (*Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus*) em momentos distintos. Em cada uma dessas infecções, as larvas provenientes das colônias de laboratório e das populações de campo foram criadas ao mesmo tempo, sob condições idênticas, como mesma quantidade de larvas e disponibilidade de alimento por recipiente de criação, além de rotação periódica desses recipientes na sala de criação a fim de minimizar as diferenças na exposição de luz e temperatura.

### 6.2 Preparação dos estoques de vírus em células C6/36

As amostras dos diferentes sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) usados para a preparação dos estoques no presente estudo foram disponibilizadas pelo Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e pertencem à coleção de vírus daquele laboratório. As cepas de DENV-1 (EU259529), DENV-2 (EU259569) e DENV-3 (EU259607) foram isoladas de pacientes durante as epidemias de

dengue ocorridas no Estado nos anos de 1997, 1995 e 2002, respectivamente. Para preparação dos estoques de DENV, os vírus foram expandidos em garrafas de cultura contendo células C6/36 ( $75 \text{ cm}^2$ ), conforme descrição a seguir. Garrafas de cultura de células contendo  $3 \times 10^5$  células/ml em meio L-15 de crescimento (meio Leibovitz suplementado com 5% de soro fetal bovino) foram preparadas para cada sorotipo viral. Após 48 horas, o meio de crescimento foi retirado e 1 ml da suspensão viral (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) foi inoculado na respectiva garrafa de cultura. Após 1 hora para adsorção do vírus, foram adicionados às garrafas 30 ml de meio L-15 de manutenção (meio Leibovitz suplementado com 2% de soro fetal bovino). As garrafas de cultura foram colocadas na estufa a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  e foram observadas, diariamente, por 7 dias ou até a formação do efeito citopático, resultante da infecção de DENV na célula C6/36. Após o aparecimento do efeito citopático, esperou-se até 2 dias para retirá-las da estufa. As garrafas passaram por processos de congelamento em freezer a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  e descongelamento em banho-maria a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por três vezes, com o objetivo de lisar as células e liberar as partículas virais. A suspensão foi transferida para um tubo de 50 ml que, posteriormente, foi centrifugado a 2000-2500 rpm por 10 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 50 ml. A este sobrenadante, foi adicionado 20% do volume recuperado de soro fetal bovino e o volume total foi distribuído em criotubos em alíquotas de 0,5-1 ml e armazenados em freezer  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  até a sua utilização. Este procedimento foi realizado para os três sorotipos usados no presente trabalho.

Para determinar o título do estoque de cada sorotipo utilizado na infecção oral, em unidade formadora de foco por mililitros (FFU/ml), foi realizada a técnica de titulação por peroxidase em C6/36 seguindo o protocolo de Das *et al.* (2007) com modificações na revelação do ensaio conforme descrição na seção 6.4.

### **6.3 Propagação de vírus Dengue em células C6/36**

Os vírus usados na alimentação sanguínea dos mosquitos foram inicialmente propagados em células C6/36. Para cada sorotipo foi preparada uma garrafa de cultura ( $25 \text{ cm}^2$ ) com aproximadamente  $6 \times 10^6$  células adicionadas a 10 ml de meio Leibovitz suplementado com 5% de soro fetal bovino (meio L-15 de crescimento). Após 2 horas para a formação da monocamada, o meio L-15 de crescimento foi desprezado e 250  $\mu\text{l}$  de cada estoque viral foram colocados na garrafa de cultura. As garrafas foram colocadas na estufa a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 hora para a adsorção do vírus nas células e, após o tempo decorrido, 10 ml de

meio L-15 de manutenção foram adicionados em cada garrafa de cultura. Após este procedimento, as garrafas foram colocadas novamente na estufa a 28 °C sendo observadas diariamente em microscópio invertido para acompanhamento da formação do efeito citopático. Quando 80-90% das células contidas nas garrafas de cultura apresentaram efeito citopático, as garrafas passaram por processos de congelamento em freezer -80 °C e descongelamento em banho-maria a 37 °C por três vezes e então misturadas ao sangue de carneiro desfibrinado na proporção de 1:1.

#### 6.4 Titulação por peroxidase

A titulação por peroxidase tem como objetivo determinar o título dos estoques e dos vírus usados na alimentação artificial e, além disso, avaliar o efeito da infecção de diferentes cargas virais utilizadas na alimentação artificial sanguínea através da determinação do título do vírus das glândulas salivares positivas. Este procedimento foi realizado seguindo o protocolo de Das *et al.* (2007) com modificações conforme descrição a seguir. Em placas de 24 poços, foi semeado  $3 \times 10^5$  células C6/36 com o meio L-15 de crescimento em cada poço 48 horas antes da realização do ensaio. Após 48 horas foi preparada uma diluição seriada ( $1:10^1$ ,  $1:10^2$ ,  $1:10^3$ ,  $1:10^4$ ,  $1:10^5$ ,  $1:10^6$ ,  $1:10^7$  e  $1:10^8$ ) para cada amostra a ser titulada. Os meios foram retirados das placas e, logo após esta etapa, foram inoculados 200 µl de cada diluição no poço correspondente. As placas ficaram em um homogeneizador orbital (bailarina) por 15 minutos, seguido de uma incubação de 45 minutos em estufa a 28 °C para adsorção do vírus. Após a incubação, os poços foram aspirados com pipeta Pasteur e, então, foi adicionado em cada poço 1 ml de meio semi-sólido (Carboximetilcelulose 2%, meio Leibovitz 2X concentrado, antibióticos 1% e antifúngicos 1%). As placas foram levadas à estufa a 28 °C e mantidas por 5 dias. Em seguida, o meio semi-sólido foi retirado com cuidado para não remover a camada de células, os poços foram lavados com PBS 1X (0,1M; pH 7,4) e foi adicionado em cada poço 1 ml de acetona 30% por 13 minutos para fixação das células. A acetona foi, então, retirada por inversão e as placas foram colocadas para secar em estufa a 37 °C por 24 horas. Após 24 horas, as placas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal (líquido ascítico murino anti-dengue 1, 2 ou 3, gentilmente cedido por Biomanguinhos) a 37 °C por 1 hora e, em seguida, lavadas três vezes com PBS 1X (0,1M; pH 7,4). Após as lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário HRP-rec-Protein G (Invitrogen – cat. N° 10-1223) a 37 °C por 1 hora e, em seguida, lavadas



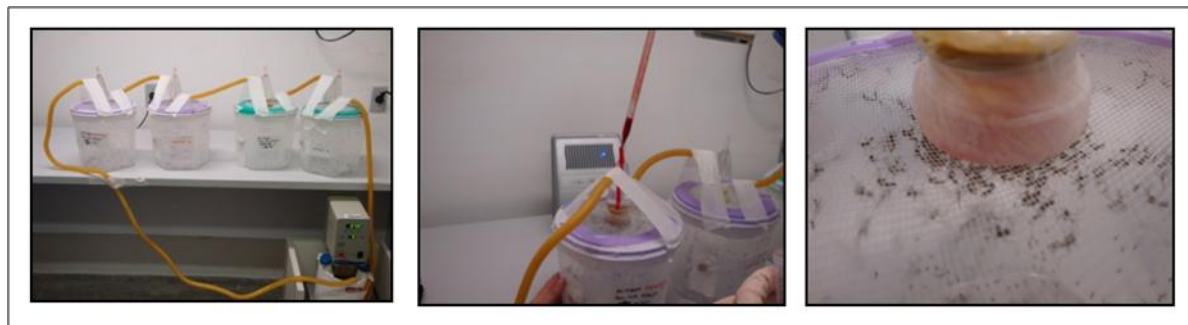
novamente três vezes com PBS 1X (0,1M; pH 7,4). Após as lavagens, foi adicionado a cada poço o substrato AEC (Sigma – cat. N° A6926) para revelação dos focos, e os ensaios foram feitos em duplicata e o título foi obtido através da quantificação das unidades formadoras de focos por ml (FFU/ml) usando a fórmula:

$$\text{Título (FFU/ml)} = \text{média de focos da última diluição} \times \text{última diluição} (10^n) \times \text{fator de diluição}$$

onde n é o número da última diluição correspondente à visualização dos focos.

### 6.5 Infecção oral dos mosquitos com DENV

Todo o procedimento de infecção artificial oral dos mosquitos foi realizado no infectório do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães, onde as etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas dentro das normas internacionais de biossegurança e bioproteção. O procedimento de infecção oral com DENV seguiu o protocolo descrito por Salazar *et al.* (2007) com algumas modificações, conforme descrição a seguir. A alimentação sangüínea artificial com sangue de carneiro desfibrinado foi conduzida utilizando fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* nulíparas com 7-10 dias de emergência. Um total de 200-250 fêmeas de mosquitos, cuja alimentação com sacarose e água foi retirada 24 horas antes da infecção oral, foram alimentadas durante 45-60 minutos com uma mistura de suspensão de vírus previamente expandida em células C6/36 e sangue na proporção de 1:1. Esta mistura foi mantida a 37 °C em um alimentador artificial durante a alimentação oral (Figura 8). Após a alimentação, os mosquitos foram anestesiados em gelo e mantidos em placa fria para separação das fêmeas ingurgitadas. As fêmeas que não se alimentaram adequadamente foram descartadas do estudo. O grupo controle, que consiste em mosquitos alimentados com sangue limpo, livre de partículas virais, também foi incluído em cada ensaio.

**Figura 8** - Esquema da alimentação artificial via oral com vírus Dengue em populações de mosquitos.

**Fonte:** o autor.

Neste trabalho, foram feitas infecções experimentais, com as duas espécies, com o objetivo de testar parâmetros como tempo de alimentação dos mosquitos e relação entre o dia de coleta das células infectadas para a mistura com o sangue e as taxas de infecção e disseminação do DENV nos tecidos analisados. Em cada uma dessas sessões de infecção, cada população de mosquito da mesma espécie (laboratório e campo) foi alimentada com os três sorotipos simultaneamente, porém em gaiolas separadas por sorotipo. Além disso, as infecções com *Ae. aegypti* foram realizadas em momento diferente das infecções com *Ae. albopictus*.

## 6.6 Dissecção dos mosquitos e extração de RNA total

Para cada população, foram coletados de cinco a dez mosquitos em diferentes momentos ao longo de 21 dias após infecção (dpi) com DENV (3°, 7°, 11°, 15° e 21° dpi). Os mosquitos coletados foram dissecados em solução salina com auxílio de lupa. Intestinos e glândulas salivares foram colocados separadamente em microtubos de 1,5 ml contendo 300 µl de um diluente para mosquitos contendo PBS 1X (0,1M; pH 7,4), soro fetal bovino 10 %, antibiótico 1% e antifúngico 1% (LAMBRECHTS *et al.*, 2009). Todas as amostras foram estocadas a -80 °C até a sua utilização.

Os RNAs utilizados neste ensaio foram extraídos usando o protocolo de extração de RNA por Trizol seguindo o protocolo do fabricante com modificações. Os tecidos (intestinos e glândulas salivares) foram homogeneizados com micropistilo e, após a homogeneização do material, 100 µl desta mistura foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml contendo 200 µl de Trizol (Invitrogen cat. N° 15596-026). Após homogeneização deste material e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado ao microtubo 100 µl de

clorofórmio. A mistura foi novamente homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 3 minutos. Após incubação, os microtubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 12000 rpm por 15 minutos. A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 250 µl de isopropanol. Ao término da homogeneização e incubação por 10 minutos, o microtubo foi novamente centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado com cuidado para não descartar o *pellet* de RNA. O *pellet* foi lavado com 300 µl de etanol 75% e, após centrifugação de 5 minutos a 10500 rpm, o etanol foi descartado e o microtubo foi levado à estufa a 37°C por 20 minutos para secagem do material. O RNA então foi ressuspendido em 30 µl de água livre de DNases e RNases. Após a extração, os RNAs foram tratados com DNase (Turbo DNase-Ambion, cat No AM2239), seguindo as recomendações do fabricante, com a finalidade de evitar contaminação com DNA genômico. Após o tratamento com DNase, os RNAs foram estocados no freezer -80 °C até a sua utilização.

## 6.7 Reações de RT-PCR convencional com primers NS5

Os RNAs extraídos dos estoques de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, previamente testados pela técnica de RT-PCR convencional com os *primers* descritos por Lanciotti *et al.* (1992), foram usados na técnica de RT-PCR convencional com os *primers* de NS5 descritos por Kong *et al.* (2006) com o objetivo de testar a funcionalidade desses *primers* na qRT-PCR. A primeira etapa realizada foi síntese do cDNA, a partir do RNA total extraído, usando a enzima AMV transcriptase reversa conforme descrição do protocolo do fabricante (Cloned AMV Reverse Transcriptase, Cat. No. 12328-019, Invitrogen). Após a síntese do cDNA, a reação de amplificação do gene NS5 foi realizada em um volume final de 25 µl, usando a seguinte mistura: 12,5 µl de PCR Master mix (Promega Cat. No. M7505), 10 µM de cada *primer* (Forward e Reverse), 2 µl do cDNA e H<sub>2</sub>O para completar 25 µl da reação. Essa reação foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado para 1 ciclo a 95° C por 15 minutos, 40 ciclos a 94° C por 15 segundos, 58° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos e um ciclo final a 72° C por 10 minutos. Os produtos da RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002M, pH 8,3) e corado com brometo de etídeo. Após a eletroforese de 40 min a 120 V, os géis foram fotografados em um transiluminador de ultravioleta.

## 6.8 Síntese dos padrões de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 usados na RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

A quantificação da carga viral nos diferentes tecidos por RT-PCR quantitativa foi realizada a partir da comparação com uma curva padrão usando a quantificação absoluta. Esta curva padrão foi obtida a partir de diluições seriadas do transcrito de RNA previamente quantificado no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para se obter estes padrões com a quantidade de RNA conhecida é necessária a realização de uma síntese *in vitro* do RNA dos três sorotipos do vírus a partir do produto específico de RT-PCR. A transcrição *in vitro* foi realizada usando o kit da Ambion (MEGAscript T7 kit, cat No AM1334), onde os *primers* usados na transcrição foram os mesmos da qRT-PCR, com modificação do *primer forward* no qual foi inserido uma seqüência T7 promotora. A transcrição *in vitro* para cada sorotipo foi realizada em um volume de 20 µl usando a seguinte mistura: 2 µl de cada solução de dinucleotídeos (ATP, CTP, GTP e UTP), 2 µl do mix de enzimas, 2 µl do tampão 10X, 1 µl do produto da RT-PCR diluído (1:10) e água livre de DNase e RNase para completar o volume necessário da reação. As reações foram homogeneizadas gentilmente, centrifugadas rapidamente e incubadas a 37° C por 7 horas. Após a incubação, foi adicionado em todos os tubos 10 µl de DNase (Turbo DNase-Ambion, cat No AM2239). Essa mistura foi novamente homogeneizada, centrifugada e incubada a 37° C por 1 hora. A partir dessa etapa, os transcritos foram purificados com fenol-clorofórmio conforme descrição a seguir. Foi adicionado aos tubos contendo os transcritos tratados 320 µl de água e 350 µl fenol:clorofórmio:isoamil álcool (Invitrogen). A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12000 rpm por 4 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela foram adicionados 60 µl de acetato de sódio e 1 ml de etanol 100% gelado. Os tubos foram levados para o freezer – 80° C, onde permaneceram por 20 minutos. Após essa incubação, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi deixado em temperatura ambiente para secar por 10 minutos e, então, ressuspenso em 50 µl de água. Após a transcrição *in vitro*, o RNA foi quantificado no Nanodrop e esta quantificação foi convertida em cópias de RNA usando a fórmula abaixo descrita por Kong *et al.* (2006):

$$\text{Número de moléculas do RNA}/\mu\text{l} = \frac{\text{quantidade do RNA (g}/\mu\text{l)}}{\text{tamanho do transcrito (pb)} \times 340} \times 6,02 \times 10^{23}$$

O transcrito de RNA foi, então, diluído serialmente em água livre de DNase e RNase e estocado em freezer -80 °C até a sua utilização.

## 6.9 RT-PCR quantitativa com primers NS5 (qRT-PCR)

Antes da realização da técnica de RT-PCR quantitativa, o RNA total de cada tecido coletado em diferentes pontos durante o PIE foi quantificado no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A quantificação no NanoDrop foi necessária para normalização de todas as amostras usadas no ensaio.

A qRT-PCR foi feita com o kit Quantitect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, cat. N° 204245). Os *primers* usados nos ensaios de transcrição *in vitro* e qRT-PCR, localizados em uma região conservada da proteína não estrutural do DENV (NS5), foram sintetizados a partir das seqüências descritas por Kong *et al.* (2006) (Quadro). Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500) instalado no Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Para cada reação foram usados: SYBR Green Master mix 1X, 0,2 µM de cada primer (Forward e Reverse), 0,2 µl da enzima RT, 5 µl de cada amostra normalizada para 50 ng e H<sub>2</sub>O para completar 25 µl de reação. O programa de amplificação consistiu em ciclos de 50 °C por 30 minutos, 95 °C por 15 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 58 °C por 30 segundos 72 °C por 30 segundos. A reação de qRT-PCR foi realizada medindo-se a intensidade de fluorescência do Sybr-Green I, na qual todas as amostras podem ser comparadas. 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 (Cycle threshold) dessas amostras quando comparados aos valores de Ct da curva padrão. Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo software ABI (versão 2.0.4) da Applied Biosystems. As análises estatísticas, tais como teste t de Student e Análise de Variância simples (ANOVA), para comparação do número de cópias do RNA viral detectado ao longo do PIE de cada população, foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 4.00. As diferenças foram consideradas significantes quando  $P < 0,05$ .

**Quadro** - Lista dos *primers* NS5, e suas respectivas seqüências, usados na transcrição *in vitro* e na RT-PCR em tempo real para quantificação da carga viral dos diferentes sorotipos de dengue.

<i>Primers</i>	<b>Seqüência 5' – 3'</b>
IVT NS5F	<b>TAATACGACTCACTATAGGG</b> -GGAAGGAGAAGGACTGCACA
NS5F	GGAAGGAGAAGGACTGCACA
NS5R	ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT

**Nota:** A seqüência em negrito representa a seqüência promotora T7

Além da quantificação do RNA viral em diferentes momentos do período de incubação extrínseco, a qRT-PCR também foi usada para estimar as taxas de infecção, disseminação e a competência vetorial dos diferentes sorotipos de DENV nas populações de *Aedes* sp. no último momento analisado (21° dpi). A taxa de infecção foi calculada pelo número de indivíduos que apresentaram intestinos positivos dividido pelo total de mosquitos analisados. A taxa de disseminação foi calculada pelo número de indivíduos com glândula salivar positiva dividido pelo total de intestinos positivos. E, finalmente, a competência vetorial foi estimada pelo número de indivíduos que apresentaram glândulas salivares positivas dividido pelo total de mosquitos analisados.

### 6.10 Detecção da taxa de infecção natural em amostras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

Com o objetivo de detectar a taxa de infecção natural pelo DENV das populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em Recife foram coletados, de Janeiro de 2005 a Junho de 2006, mosquitos adultos e ovos nas residências de pacientes com suspeita clínica de dengue. Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do CPqAM, o qual forneceu os endereços dos pacientes. Os mosquitos adultos encontrados nos ambientes intra e peri-domiciliares foram capturados com a utilização do aspirador costal modelo CDC (The Modifield CDC backpack aspirator, Modelo 1412) para posterior detecção dos possíveis sorotipos virais circulantes. Também foram instaladas armadilhas de oviposição na residência do paciente e retiradas após um período de 7 ou 8 dias após a instalação. Os ovos foram levados ao insetário e mantidos em condições ideais, já descritas anteriormente, até a forma adulta. Os RNAs foram extraídos utilizando o método da extração pela sílica de acordo com o protocolo descrito por Boom *et al.* (1990). A extração foi realizada de acordo com as etapas descritas a seguir.

Em um microtubo de 1,5 ml foi colocada a seguinte mistura: 860 µl de tampão de lise (L6) (24 g de Isotiocianato de Guanidina, 20 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4, 4.4 ml de EDTA 0.2 M pH 8.0 e 520 µl de Triton X-100), 40 µl de sílica e 100 µl da amostra (inóculo preparado a partir dos *pools* de mosquitos). A mistura foi homogeneizada rapidamente e, em seguida, colocada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Durante o repouso, esta mistura foi homogeneizada a cada 2 ou 3 minutos. Após o repouso, a mistura foi centrifugada por 10 s em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi descartado, por inversão do tubo, em uma solução de NaOH 10N.

A etapa seguinte consistiu na lavagem do *pellet* de sílica: duas vezes com 1 ml de tampão de lavagem (L2) (48 g de Isotiocianato de Guanidina e 40 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4), duas vezes com 1 ml de etanol 70% e uma vez com 1 ml de acetona PA. Após cada lavagem com o tampão L2, etanol e acetona, a mistura foi homogeneizada rapidamente, centrifugada por 10 s e o sobrenadante descartado na solução de NaOH 10N. Após as etapas de lavagem, o *pellet* foi seco a 56°C (termobloco), com as tampas abertas, por 10 min. Foi preparada uma mistura de 60 µl de água (Milli-Q estéril) e 1 µl de RNAsin (estoque contendo 1U/µl) (Invitrogen) para cada amostra e adicionada em cada microtubo de 1.5 ml. A mistura foi homogeneizada e incubada novamente a 56°C, com as tampas fechadas, por 10 min. Após a incubação, a mistura foi homogeneizada rapidamente e centrifugada em uma centrífuga refrigerada por 2 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado e transferido, usando ponteiras com barreira, para um novo microtubo de 1.5 ml devidamente registrado. Os RNAs extraídos, antes de serem utilizados na RT-PCR, foram tratados com a enzima DNase I, Recombinant (Invitrogen). Esta etapa consiste em evitar a contaminação das amostras com o DNA do mosquito eliminando, assim, os falsos positivos do diagnóstico.

Após a extração de RNA e tratamento com DNase, as amostras foram usadas na técnica de RT-PCR, seguindo o protocolo de Lanciotti *et al.* (1992). Esta reação foi realizada em dois ciclos distintos. Em um primeiro ciclo da PCR foi usado um par de *primers* consenso (Tabela 2) para o grupo Flavivírus que amplifica um fragmento de 511 pb. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl, usando a seguinte mistura: 5 µl de tampão contendo Tris-HCl 200 mM pH 8.4 e KCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.20 mM de cada dNTP, 50 mM de DTT, 25 pmoles de cada *primer* (Dcon 1 – 5' TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG e Dcon 2 – 5' TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC), 1U de RNAsin (Invitrogen), 1.0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1.0 U de RT-AMV (Invitrogen) e 5 µl do RNA extraído. A mistura foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado

para 1 ciclo a 42°C por 1 h; 30 ciclos a 94°C por 35 s, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e um ciclo final a 72°C por 10 min.

Posteriormente, foi realizado um segundo ciclo com *primers* específicos para cada sorotipo viral (TS1 – 5' CGTCTCAGTGATCCGGGGG, TS2 – 5' CGCCACAAGGGCCATGAACAG, TS3 – 5' TAACATCATCATGAGACAGAGC e TS4 – 5' CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA) que amplifica fragmentos de 489 pb, 119 pb, 290 pb e 392 pb para os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl, usando a seguinte mistura: 5 µl de tampão contendo Tris-HCl 200 mM pH 8.4 e KCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.20 mM de cada dNTP, 25 pmoles do *primer* Dcon 1, 12.5 pmoles de cada *primer* específico (TS1, TS2, TS3 e TS4), 1.0 U de Taq DNA Polimerase, 5 µl do produto do primeiro ciclo (diluído dez vezes). A mistura foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado para 18 ciclos a 94°C por 35 s, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e um ciclo final a 72°C por 10 min. Os produtos da RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002M, pH 8,3) e corado com brometo de etídeo. Após a eletroforese de 40 min a 120 V, os géis foram fotografados em um transiluminador de ultravioleta.

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

### 6.11 Considerações éticas

O presente trabalho não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.



## 7 RESULTADOS

### 7.1 Ensaio de funcionalidade dos *primers* NS5 para RT-PCR convencional e RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

Os *primers* desenhados para a região NS5 do DENV, obtidos a partir do trabalho de Kong *et al.* (2006), foram testados quanto à sua capacidade de amplificação por RT-PCR convencional nas amostras de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 usadas no presente estudo, conforme mostrado na figura abaixo. Nas amostras testadas, observou-se um fragmento de 104 pb, sem variação de tamanho nos diferentes sorotipos, indicando que os *primers* funcionaram apropriadamente (Figura 9).

**Figura 9** - Visualização em gel de agarose 1,5% de produtos de RT-PCR de DENV com os *primers* de Lanciotti *et al.* (1992) (poços 1 a 3) e NS5 de Kong *et al.* (2006) (poços 6-8).



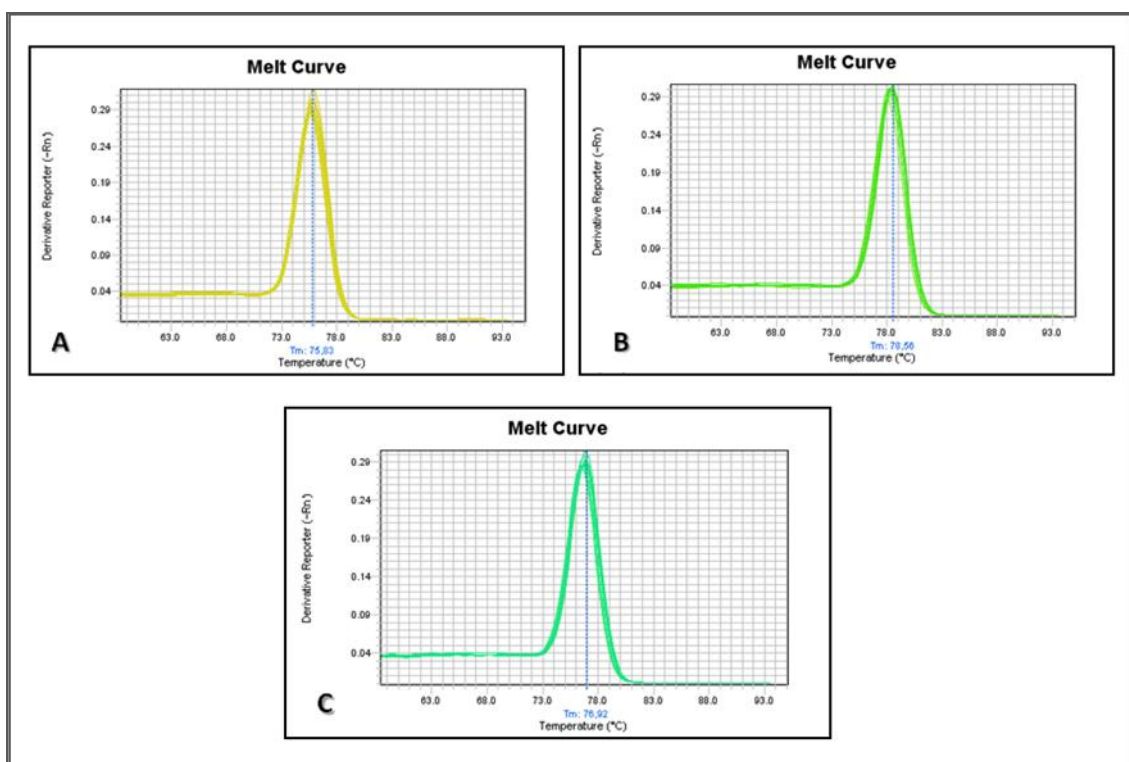
**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** Poço 1: vírus dengue sorotipo 1 (489 pb), poço 2: vírus dengue sorotipo 2 (119 pb), poço 3: vírus dengue sorotipo 3 (290 pb), poço 4: marcador de peso molecular Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen), poço 5: controle negativo, poço 6-8: vírus dengue sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente (104 pb).

Os fragmentos amplificados na reação de RT-PCR convencional foram usados para síntese dos padrões de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 usados no estabelecimento da curva padrão para quantificação da carga viral em intestinos e glândulas salivares das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Após a síntese, os padrões foram usados na qRT-PCR para testar a funcionalidade dos *primers*, bem como a eficiência da curva padrão. As curvas padrão apresentaram uma eficiência de aproximadamente 93% (DENV-1), 92% (DENV-2) e 89%

(DENV-3) indicando que os padrões poderiam ser usados para quantificação da carga viral. A curva de dissociação (Melting Curve) que determina a especificidade da amplificação apresentou temperaturas de dissociação distintas para cada sorotipo específico, embora os sorotipos não apresentassem diferença quanto ao tamanho do fragmento na RT-PCR convencional. As temperaturas de dissociação do *primer* foram: 75,83°C para DENV-1; 78,56°C para DENV-2 e 76,92°C para DENV-3 (Figura 10).

**Figura 10** - Curva de dissociação da RT-PCR quantitativa dos vírus dengue usando os *primers* NS5.



**Fonte:** Dados da autora.

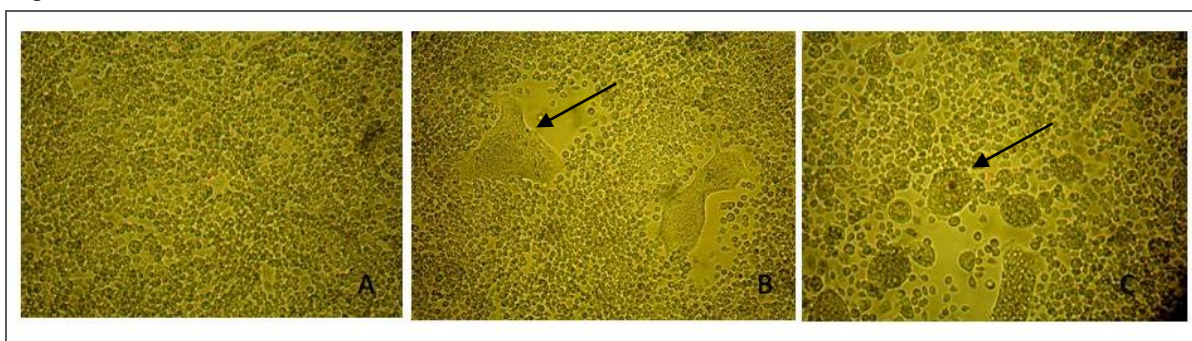
**Legenda:** A) Curva de dissociação DENV-1, B) Curva de dissociação de DENV-2 e C) Curva de dissociação de DENV-3.

## 7.2 Infecção de células C6/36 pelos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3

O título dos estoques de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 usado na propagação dos vírus em C6/36, determinado pelo ensaio de titulação por peroxidase foi, respectivamente,  $5 \times 10^5$  FFU/ml,  $1 \times 10^5$  FFU/ml e  $6 \times 10^5$  FFU/ml. As células foram infectadas com uma MOI (multiplicity of infection - multiplicidade de infecção) de 0,02 para DENV-1, 0,004 para DENV-2 e 0,025 para DENV-3 e, posteriormente, adicionadas ao sangue para alimentação artificial quando o efeito citopático atingiu 80-90% das células C6/36. As células infectadas

com DENV-1 começaram a apresentar o efeito citopático a partir do 2º dpi, enquanto que as células infectadas com DENV-2 e DENV-3 começaram a apresentar o efeito citopático a partir do 3º dpi (Figura 11). As tabelas 3 e 5 mostram os dias, decorridos desde a infecção em C6/36 até a visualização do efeito citopático, em que as células infectadas com DENV foram misturadas ao sangue para alimentação artificial dos mosquitos *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, respectivamente.

**Figura 11** - Perfil do efeito citopático em células C6/36 infectadas com DENV visualizadas em microscópio óptico.



**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Células não infectadas; B) Células infectadas com DENV-1 no 2º dia pós-infecção; C) Células infectadas com o DENV-2 no 3º dia pós-infecção. Aumento: 400 X.

**Nota:** As setas indicam as células que apresentaram efeito citopático.

### 7.3 Replicação e tropismo de DENV em populações de *Ae. albopictus*

Para avaliar a competência vetorial das populações de *Ae. albopictus* aos três sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) foram realizados dois experimentos. No primeiro, foi usada apenas a colônia de laboratório com o objetivo de padronizar a metodologia de infecção artificial de *Ae. albopictus*. No segundo, além da colônia de laboratório também foi usada uma população de campo (Recife). Nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dpi, intestinos e glândulas salivares foram dissecados e testados por qRT-PCR para verificar a presença do vírus nos tecidos citados. Os parâmetros usados nas infecções artificiais com DENV nas populações de *Ae. albopictus*, como o dia da coleta das células infectadas usadas nas alimentações e o título do sangue no momento da alimentação estão resumidos na tabela 2.

**Tabela 2** - Parâmetros usados nas infecções de *Aedes albopictus* com DENV1, DENV2 e DENV3.

	Dia de coleta das células infectadas usadas na infecção artificial *			Título do vírus no sangue (FFU/ml)		
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-1	DENV-2	DENV-3
1ª infecção	4	6	4	$8 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$
2ª infecção	5	5	7	$4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$5,25 \times 10^5$

\*Quantidade de dias decorridos desde a infecção do estoque de vírus em C6/36 até a visualização do efeito citopático.

Ao final do 21º dpi foram calculadas as taxas de infecção e disseminação de DENV nas populações de *Ae. albopictus*, que estão apresentadas na tabela 3 e descritas a seguir. As populações estudadas foram suscetíveis aos três sorotipos de DENV. No primeiro experimento, as taxas de infecção na colônia de laboratório para DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foram de 8%, 52% e 28%, respectivamente. Considerando as taxas de disseminação, os valores encontrados foram de 100% para DENV-1, 46% para o DENV-2 e 0% para o DENV-3. A competência vetorial da população de laboratório calculada ao final do 21º dpi na primeira alimentação para DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foi de 16%, 24% e 0%, respectivamente. No segundo experimento, as taxas de infecção, disseminação e competência vetorial foram maiores na colônia de laboratório do que na população de Recife. As taxas de infecção na colônia de laboratório foram de 27%, 60% e 14,5%, enquanto que na população de Recife foram de 16,6%, 23% e 6,25% para DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente. Considerando as taxas de disseminação, os valores encontrados na colônia de laboratório foram de 92%, 79% e 71% para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente, enquanto que na população de Recife a taxa de disseminação para DENV-1 apresentou um valor de 87,5% e para DENV-2 e DENV-3 esta taxa foi de 100%. A competência vetorial, ao final do 21º dpi no 2º experimento, da colônia de laboratório para DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foi de 25%, 48% e 10%, respectivamente, e da população de Recife, 14,5%, 32% e 14,5%, respectivamente.

**Tabela 3.** Taxas de infecção e disseminação de DENV nas populações de *Ae. albopictus* ao final do 21º dia pós-infecção.

Sorotipo	Título (FFU/ml)	Taxa de infecção (%)*		Taxa de Disseminação (%)**	
		Laboratório	Recife	Laboratório	Recife
DENV-1 (1ª infecção)	8,0 X 10 <sup>4</sup>	8	-	100	-
DENV-2 (1ª infecção)	3,7 X 10 <sup>5</sup>	52	-	46	-
DENV-3 (1ª infecção)	6,2 X 10 <sup>4</sup>	28	-	0	-
DENV-1 (2ª infecção)	4,0 X 10 <sup>5</sup>	27	16,6	92	87,5
DENV-2 (2ª infecção)	7,5 X 10 <sup>5</sup>	60	23	79	100
DENV-3 (2ª infecção)	5,25 X 10 <sup>5</sup>	14,5	6,25	71	100

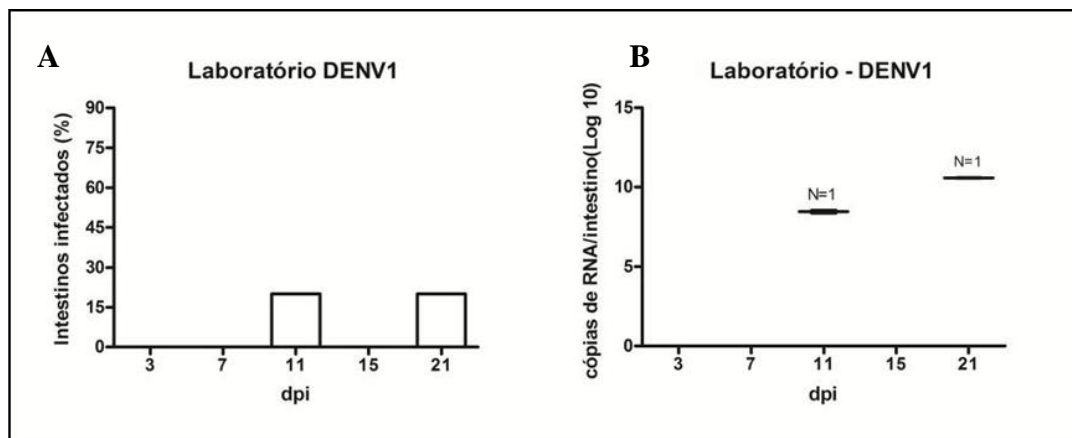
\*Quantidade de intestinos positivos dividida pelo número de mosquitos analisados

\*\* Quantidade de glândulas salivares positivas dividida pelo número de intestinos positivos

### 7.3.1 Replicação e tropismo de DENV-1 em intestino e glândula salivar de populações de *Ae. albopictus*

Na primeira infecção artificial com DENV-1 usando a colônia de laboratório de *Ae. albopictus* foi identificada a presença do vírus em intestinos coletados em dois momentos, o 11º e o 21º dpi, ambos com taxa de infecção de 20%. Nesta infecção, a mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 4º dia pós-infecção em células C6/36) apresentou um título de  $8 \times 10^4$  FFU/ml (unidade formadora de foco/ml) (Tabela 2). A quantificação da carga viral das amostras positivas por qRT-PCR mostrou que houve variação entre  $10^8$  e  $10^{10}$  cópias de RNA por intestino analisado (Figura 12).

**Figura 12** - Perfil de infecção por DENV1 em amostras de intestinos da colônia de laboratório de *Ae. albopictus* coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.

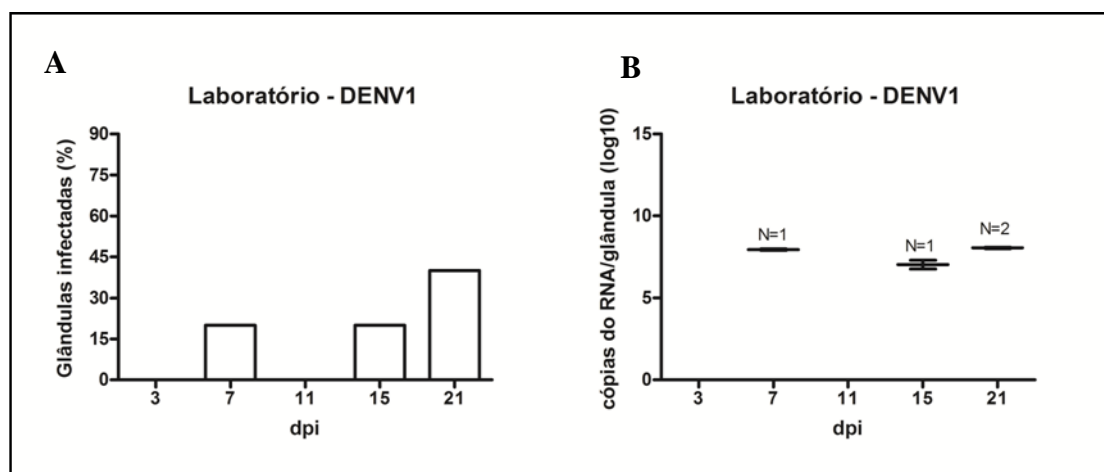


**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 5 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Com relação à glândula salivar, nos 7° e 15° dpi foi detectada a presença do vírus em 20% das glândulas analisadas com aumento dessa taxa para 40% no 21° dpi. A quantificação da carga viral das glândulas positivas mostrou que o número de cópias variou significativamente entre  $10^7$  e  $10^8$  cópias de RNA viral por órgão (ANOVA,  $P = 0,0321$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 13).

**Figura 13** - Perfil de infecção por DENV1 em amostras de glândulas salivares da colônia de laboratório de *Ae. albopictus* coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.

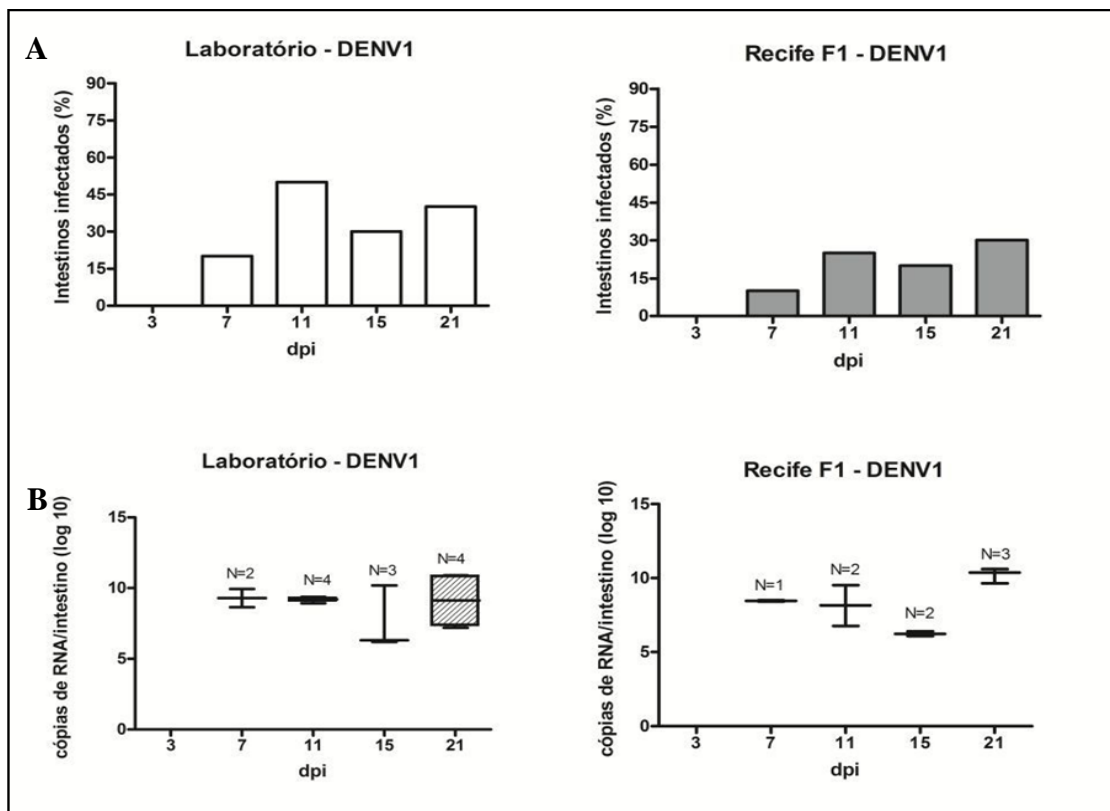


**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 5 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Na segunda infecção artificial com o DENV-1 onde, além da colônia de laboratório, foi incluída no ensaio a população de campo Recife, a presença do vírus no intestino foi detectada a partir do 7º dpi nas duas populações estudadas com uma taxa de infecção maior na colônia de laboratório (20%) quando comparada à população de campo (10%). Até o 21º dpi foram identificadas, em todos os momentos, amostras positivas nas duas populações estudadas. Na colônia de laboratório, a maior taxa de infecção dos intestinos ocorreu no 11º dpi com 50% das amostras positivas para o DENV-1, enquanto que na população Recife, a maior taxa de infecção detectada ocorreu no 21º dpi com 30% dos intestinos infectados com DENV-1 (Figura 14). A coleta da suspensão viral para adição ao sangue de carneiro foi realizada no 5º dia pós-infecção em células C6/36 e, desta maneira, foi possível aumentar o título do vírus usado na infecção artificial para  $4 \times 10^5$  FFU/ml (Tabela 2). A quantificação da carga viral nas amostras positivas por qRT-PCR mostrou uma variação entre  $10^6$  a  $10^{10}$  cópias de RNA por órgão (Figura 14). Esta variação no número de cópias foi estatisticamente significativa na colônia de laboratório (ANOVA,  $P = 0,0003$ ;  $P < 0,001$ ), assim como na população Recife (ANOVA,  $P = 0,0343$ ;  $P < 0,05$ ).

**Figura 14** - Perfil de infecção por DENV1 em amostras de intestinos das populações de *Ae. albopictus* de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2<sup>a</sup> infecção.



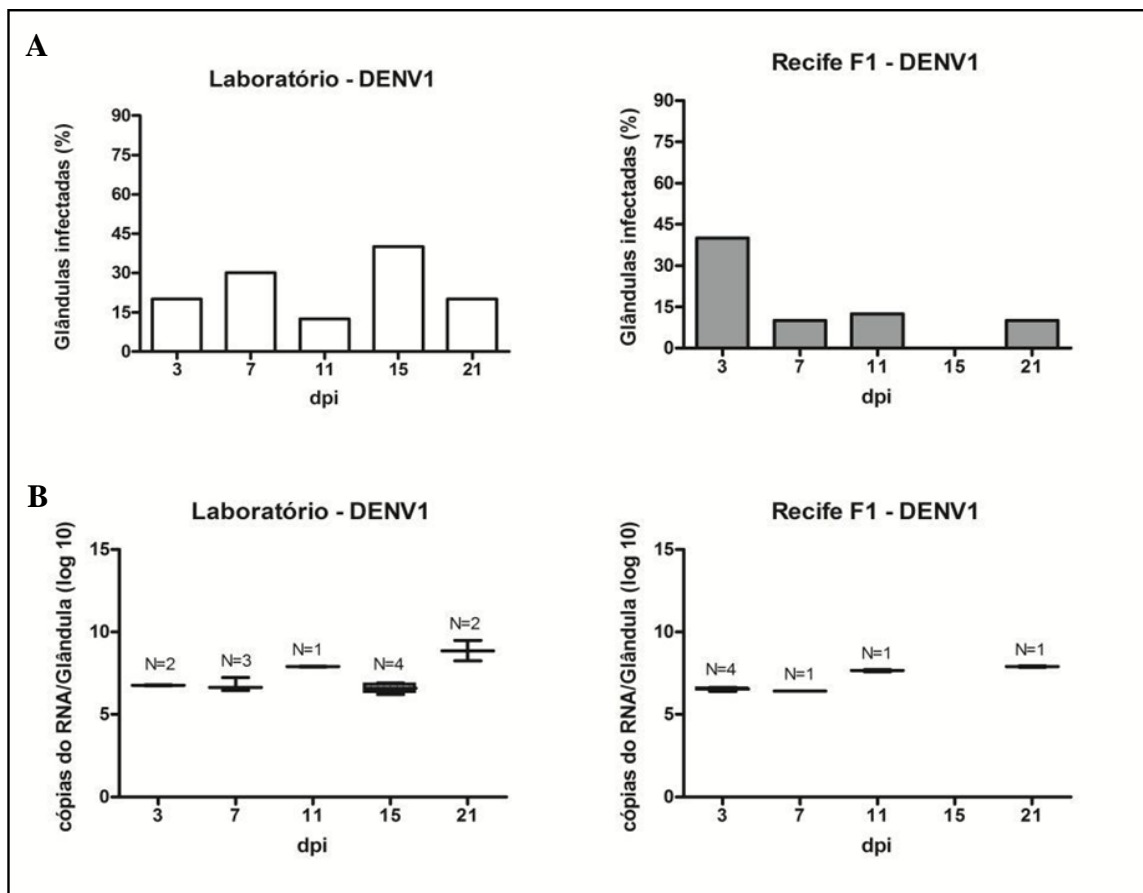
**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Para a glândula salivar, amostras positivas foram detectadas no 3<sup>o</sup> dpi nas duas populações estudadas, quando a taxa de infecção da colônia de laboratório foi de 20% e a da população de Recife foi de 40%. Para a população de laboratório foram detectadas glândulas positivas em todos os intervalos analisados, com maior taxa de infecção de 40% detectada no 15<sup>o</sup> dpi. Na população Recife também foi identificada a presença de glândulas salivares positivas em quase todos os pontos analisados exceto no 15<sup>o</sup> dpi, bem como, a maior taxa de infecção (40%) também foi encontrada no 3<sup>o</sup> dpi. A quantificação da carga viral nessas amostras mostrou uma variação estatisticamente significativa de  $10^6$  a  $10^9$  cópias de RNA por órgão (ANOVA,  $P = 0,0034$ ;  $P < 0,05$ ) na colônia de laboratório (Figura 15).



**Figura 15** - Perfil de infecção por DENV1 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. albopictus* de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



**Fonte:** Dados da autora.

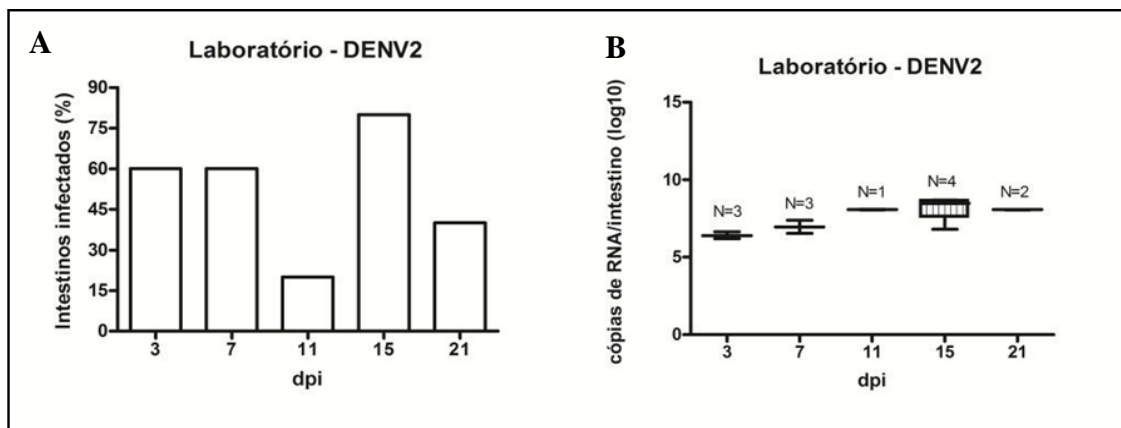
**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

### 7.3.2 Replicação e tropismo de DENV-2 em intestino e glândula salivar de populações de *Ae. albopictus*

Na primeira infecção artificial com DENV-2 usando a colônia de laboratório foram detectados intestinos positivos em todos os momentos analisados. Nos 3º e 7º dpi, as taxas de infecção foram de 60%, porém caiu para 20% no 11º dpi. No 15º dpi, a taxa de infecção aumentou para 80%, sendo novamente reduzida para 40% no 21º dpi (Figura 16). Nesta infecção, a mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 6º dia pós-infecção em células C6/36) apresentava um título de  $3,7 \times 10^5$  FFU/ml (Tabela 2). Considerando a quantificação da carga viral das amostras positivas por qRT-PCR, houve uma variação estatisticamente

significante de  $10^6$  a  $10^8$  cópias de RNA por intestino analisado (ANOVA,  $P < 0,001$ ) (Figura 16).

**Figura 16** - Perfil de infecção por DENV2 em amostras de intestinos da colônia de laboratório de *Ae. albopictus* coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.

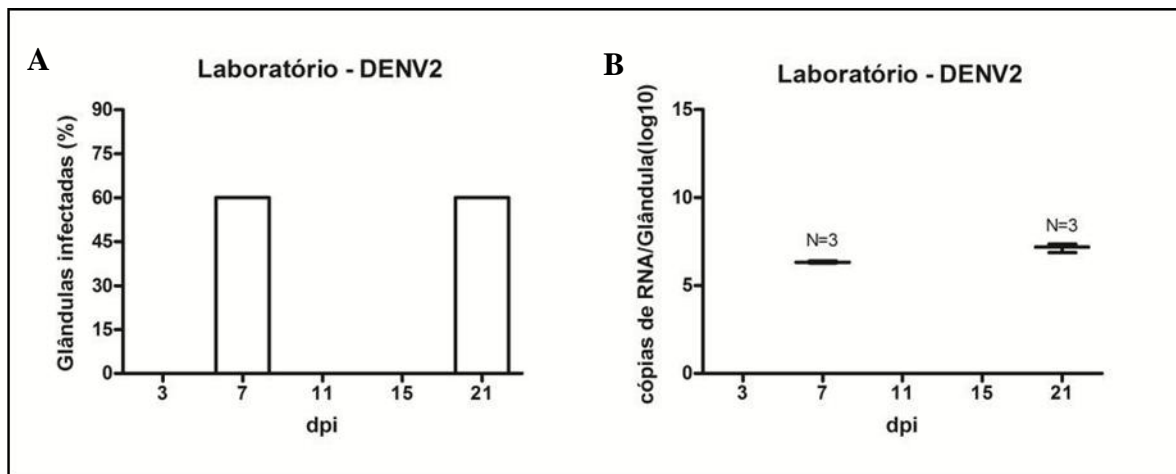


**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 5 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Com relação às glândulas salivares, as amostras positivas para o DENV-2 foram detectadas em dois momentos, nos 7º e 21º dpi apresentando uma taxa de infecção de 60%. A quantificação da carga viral das amostras positivas mostrou que a quantidade de cópias do RNA viral por órgão variou significativamente de  $10^6$  a  $10^8$  (teste t não pareado;  $p = 0,0057$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 17).

**Figura 17** - Perfil de infecção por DENV2 em amostras de glândulas salivares da colônia de laboratório de *Ae. albopictus* coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.

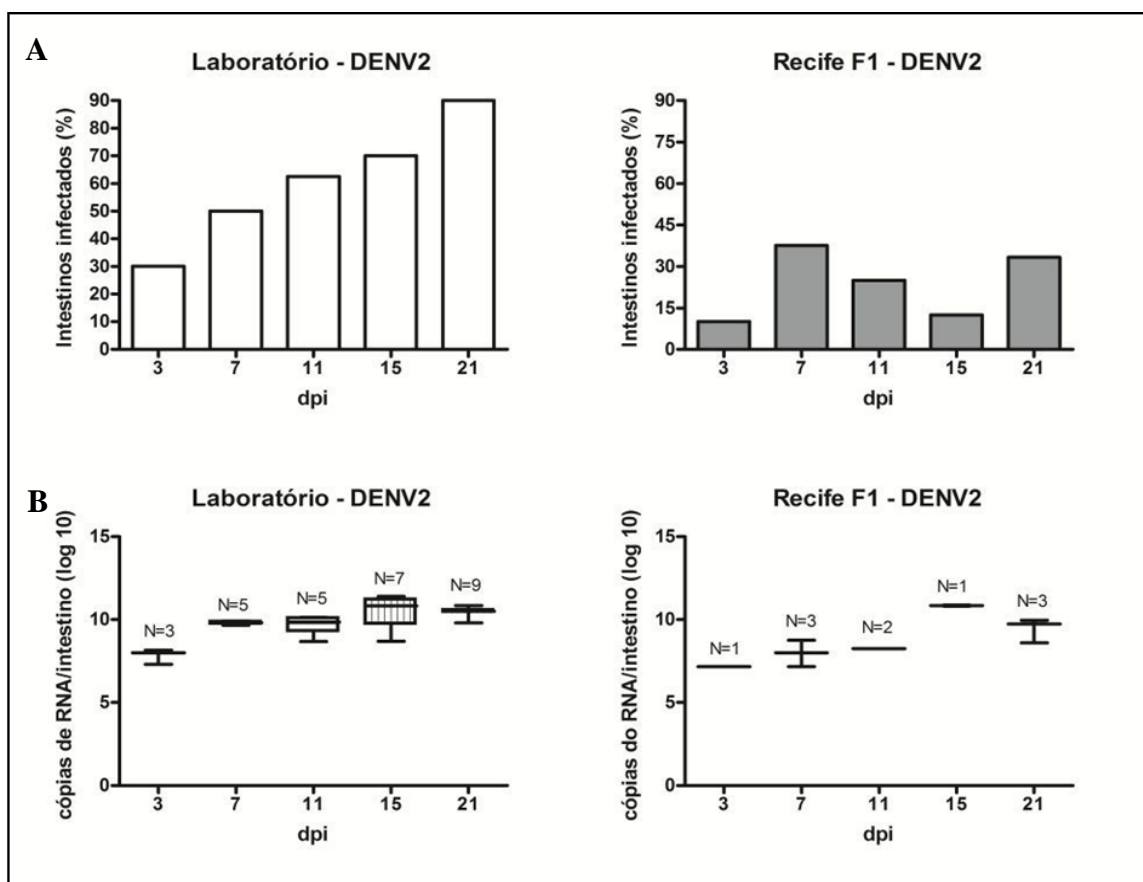


**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 5 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Na segunda infecção artificial com o DENV-2, o título da mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 5° dia pós-infecção em células C6/36) usada na alimentação artificial foi de  $7,5 \times 10^5$  FFU/ml (Tabela 2). Assim como na primeira infecção foram identificados nas duas populações intestinos positivos em todos os momentos analisados (do 3° ao 21° dpi). Na colônia de laboratório, as taxas de infecção apresentaram um padrão crescente com 50% dos intestinos positivos no 7° dpi. A maior taxa de infecção para a colônia de laboratório ocorreu no 21° dpi com 90% dos intestinos infectados com DENV-2. Na população Recife, a maior taxa de infecção foi detectada no 7° dpi com 37,5% dos intestinos positivos, caindo gradativamente nos 11° e 15° dpi e aumentando novamente para 33,3% no 21° dpi. Quanto à quantificação da carga viral neste órgão, houve uma variação de  $10^7$  a  $10^{11}$  cópias de RNA viral por órgão positivo analisado (Figura 18). A variação no número de cópias de RNA encontrada ao longo do PIE na colônia de laboratório mostrou-se estatisticamente significativa (ANOVA,  $P < 0,001$ ).

**Figura 18** - Perfil de infecção por DENV2 em amostras de intestinos das populações de *Ae. albopictus* de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



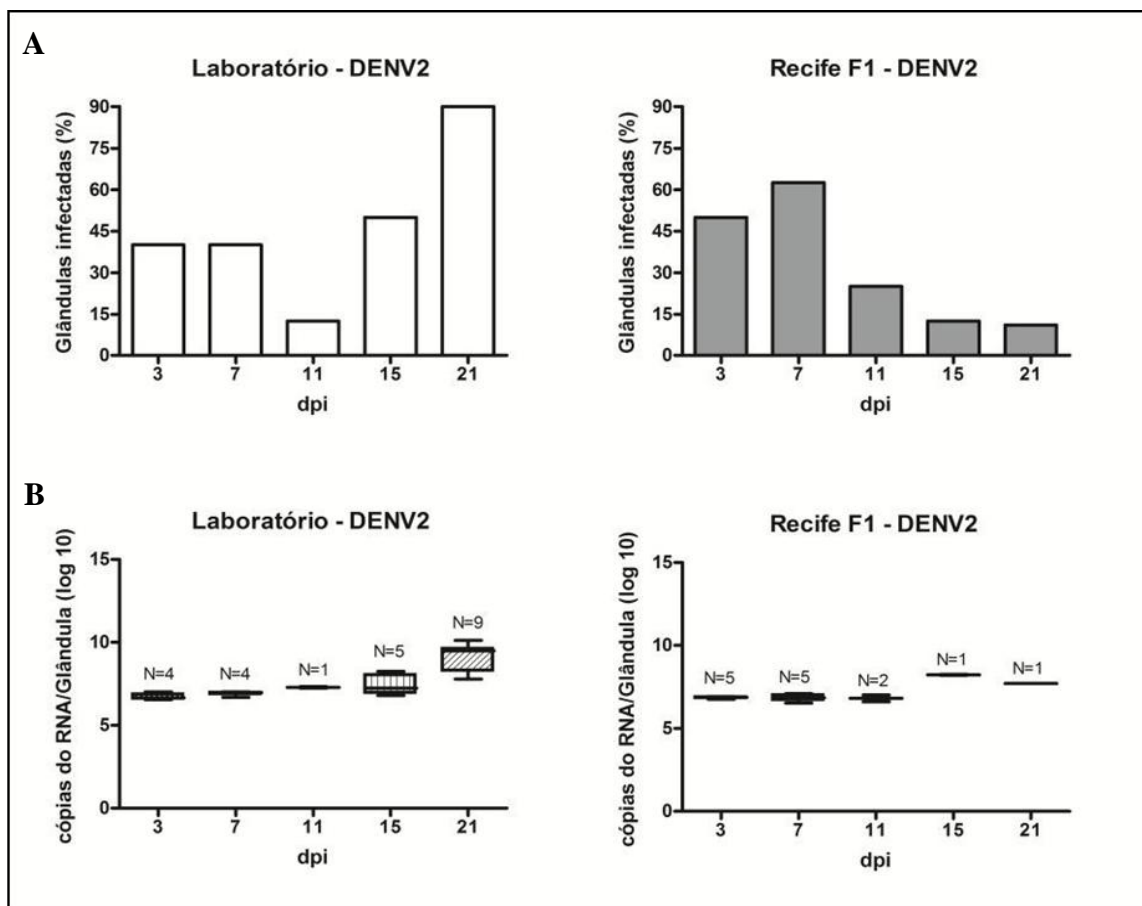
**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Nas glândulas salivares, amostras positivas também foram identificadas nas duas populações em todos os momentos analisados. Na colônia de laboratório, os 3° e 7° dpi apresentaram a mesma taxa de infecção com 40% das amostras positivas, caindo no 11° dpi e aumentando a partir do 15° dia com 50% de amostras infectadas. No 21° dpi, foi identificada a maior taxa de infecção nesta população com 90% das glândulas salivares positivas para DENV-2. Na população Recife, as amostras positivas foram detectadas a partir do 3° dpi com uma taxa de infecção de 50%. No 7° dpi foi detectada a maior taxa de infecção nessa população, com 62,5% das glândulas salivares infectadas com DENV-2. No entanto, a partir do 11° dia, a taxa de infecção caiu para 25%, depois para 12,5% no 15° dpi e no 21° dpi, 11,1% das glândulas estavam positivas para DENV-2. A quantificação da carga viral nas amostras positivas mostrou uma variação de  $10^6$  a  $10^{10}$  cópias de RNA por órgão analisado

(Figura 19). A variação no número de cópias de RNA nas glândulas salivares da colônia de laboratório ao longo do PIE mostrou-se estatisticamente significativa (ANOVA,  $P < 0,001$ ).

**Figura 19** - Perfil de infecção por DENV2 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. albopictus* de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

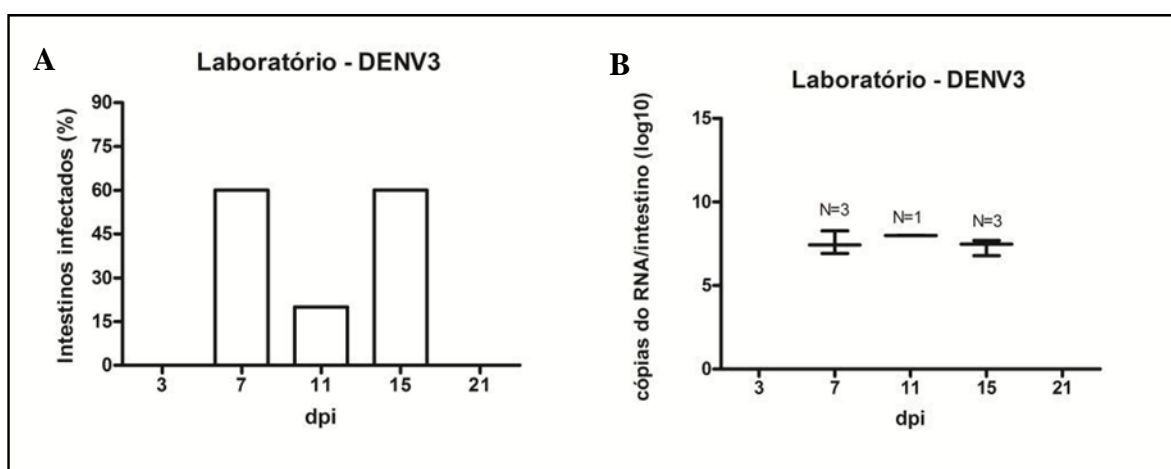
### 7.3.3 Replicação e tropismo de DENV-3 em intestino e glândula salivar de populações de *Ae. albopictus*

Na primeira infecção artificial de *Ae. albopictus* com DENV-3 a presença de intestinos positivos foi detectada no 7° dpi com taxa de infecção de 60% caindo para 20% no 11° dpi e voltando a aumentar para 60% de intestinos positivos no 15° dpi. No 21° dpi, não foi detectada a presença de amostras positivas para esta população (Figura 20). Nesta infecção, a

mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 4º dia pós-infecção em células C6/36) apresentava um título de  $6,2 \times 10^4$  FFU/ml (Tabela 2). Considerando a quantificação da carga viral das amostras positivas por qRT-PCR, ocorreu uma variação estatisticamente significativa de  $10^6$  a  $10^8$  cópias de RNA por intestino analisado (ANOVA,  $P = 0,0091$ ;  $P < 0,005$ ) (Figura 20).

Nessa infecção não foi detectada a presença de partículas virais nas amostras de glândulas salivares em nenhum dos momentos analisados.

**Figura 20** - Perfil de infecção por DENV3 em amostras de intestinos da colônia de laboratório de *Ae. albopictus* coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 1ª infecção.



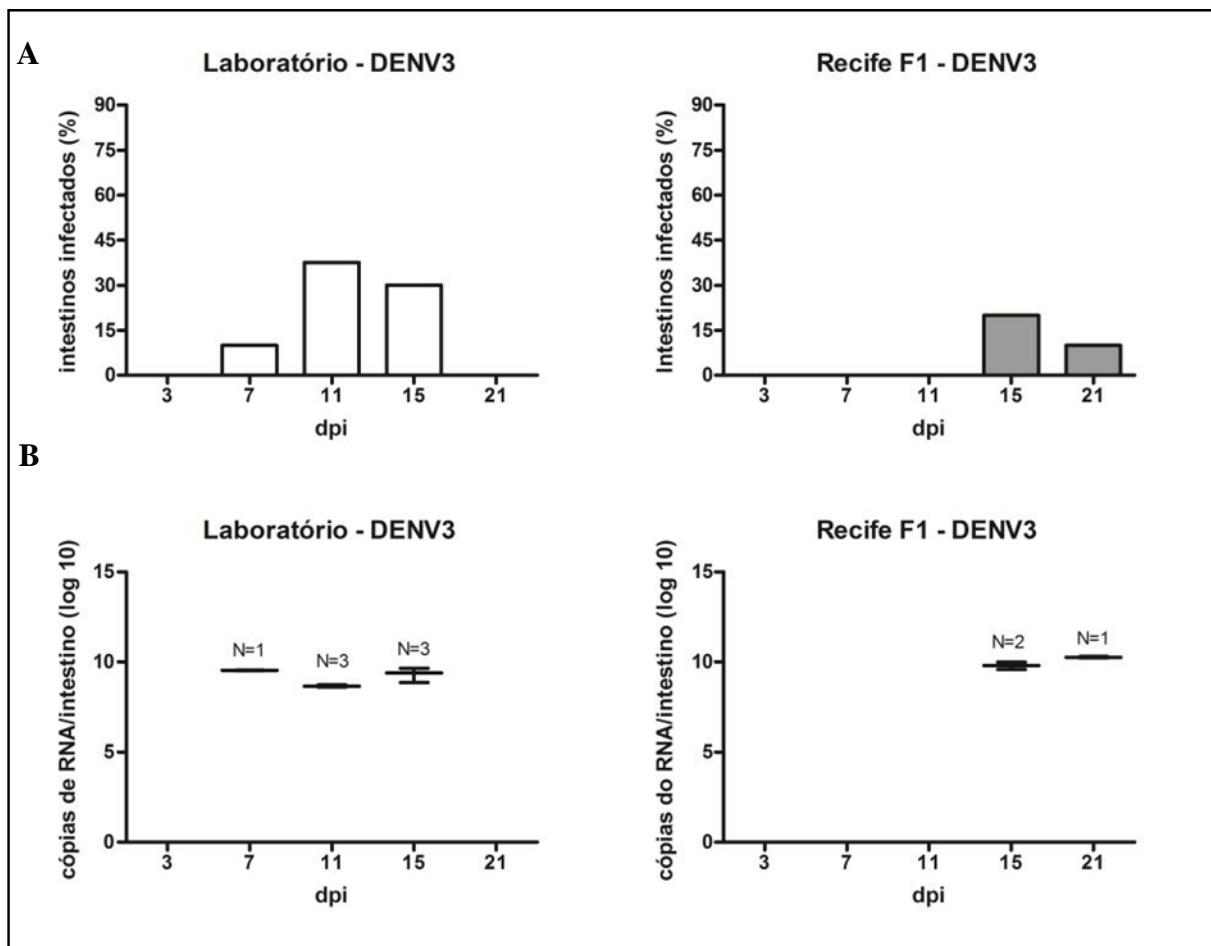
**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 5 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Na segunda infecção artificial com o DENV-3, a coleta da suspensão viral para mistura com o sangue de carneiro foi realizada no 7º dia pós-infecção em células C6/36. Além disso, a quantidade de estoque de DENV-3 inoculado em C6/36 para expansão do vírus aumentou de 250 µl para 500 µl, conseqüentemente, aumentando a MOI de 0,002 para 0,04. Dessa maneira foi possível aumentar o título do vírus usado na infecção artificial para  $5,25 \times 10^5$  FFU/ml (Tabela 2). Na população de laboratório infectada com o DENV-3, intestinos positivos foram detectados no 7º dpi com 10% das amostras positivas, com um aumento dessa taxa para 37,5% no 11º dpi e, posteriormente, caindo para 30% no 15º dpi. No 21º dpi, não foi possível detectar intestinos positivos (Figura 21). Na população Recife, intestinos positivos foram detectados em dois momentos com uma taxa de infecção de 20% no 11º dpi e 10% no 15º dpi. Considerando a quantificação da carga viral por qRT-PCR, esta variou de

$10^8$  a  $10^{10}$  cópias de RNA por intestino analisado (Figura 21). Na colônia de laboratório essa variação foi estatisticamente significativa (ANOVA,  $P = 0,0012$ ;  $P < 0,05$ ).

**Figura 21** - Perfil de infecção por DENV3 em amostras de intestinos das populações de *Ae. albopictus* de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



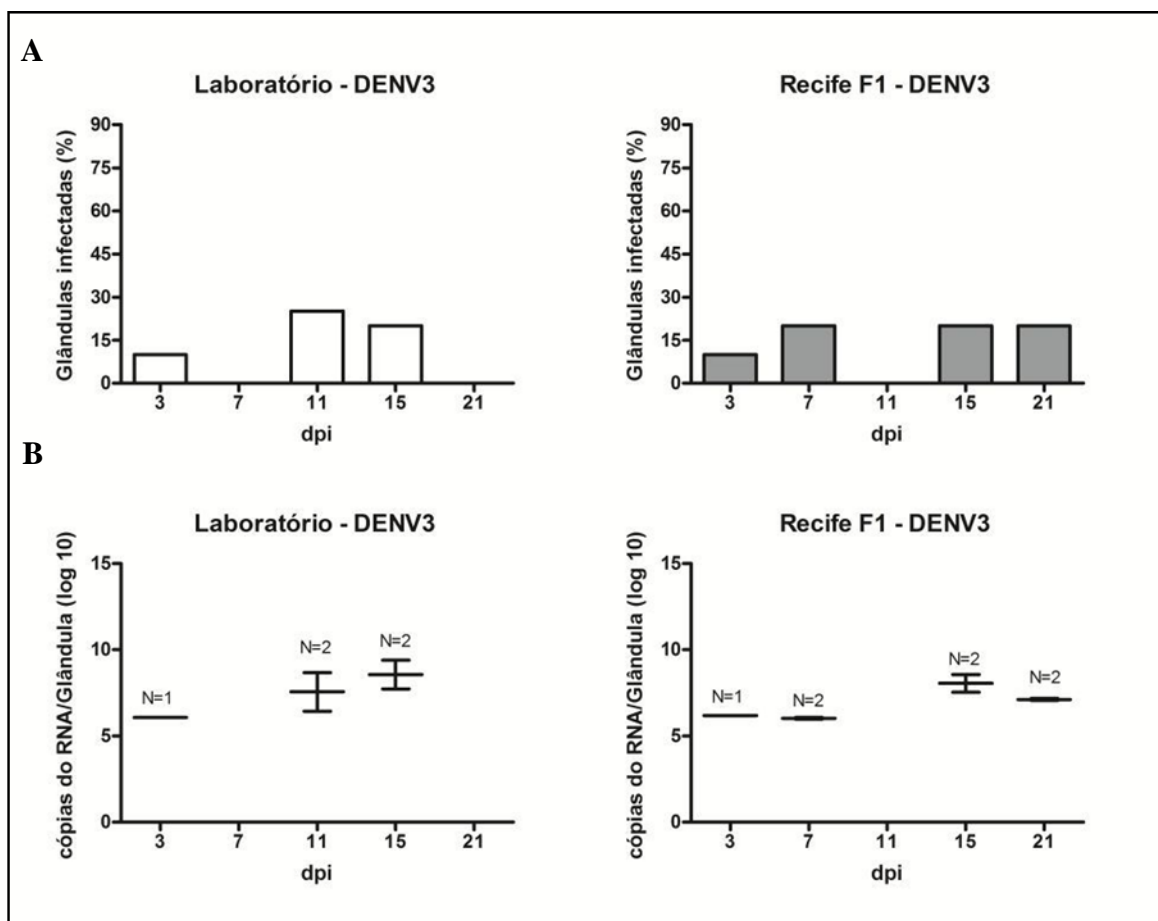
**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Em relação às glândulas salivares, foram identificadas amostras positivas nas duas populações no 3° dpi com uma taxa de infecção de 10% nas duas populações. Na população de laboratório não foram identificadas amostras positivas no 7° dpi. No entanto, nos 11° e 15° dpi os intestinos apresentaram uma taxa de infecção de 25% e 20%, respectivamente. No 21° dpi, não foi possível detectar intestinos positivos na população de laboratório. Considerando a população de Recife, o único momento no qual não foi possível detectar amostras positivas foi o 11° dpi. Nos 7°, 11° e 15° dpi, as taxas de infecção foram de 20% nos três momentos

citados. A quantificação da carga viral nas amostras positivas variou de  $10^5$  a  $10^9$  cópias de RNA por glândula analisada (Figura 22). Na população de Recife, as variações no número de cópias do RNA durante o PIE foi estatisticamente significativa (ANOVA,  $P = 0,0392$ ;  $P < 0,05$ ).

**Figura 22** - Perfil de infecção por DENV3 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. albopictus* de laboratório e campo (Recife) coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

#### 7.4 Replicação e tropismo de DENV em populações de *Ae. aegypti*

Três populações de *Ae. aegypti*, sendo uma de laboratório (RecLab) e duas de campo (Recife e Petrolina), foram infectadas artificialmente por via oral com DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Para *Aedes aegypti*, foram realizados três experimentos em diferentes momentos.



No primeiro, as três populações foram alimentadas apenas com o DENV-2, com o objetivo de padronizar as técnicas usadas no presente trabalho. Os mosquitos das populações de campo usados nesse experimento estavam na geração F2. No segundo, foram usadas duas populações (RecLab e Recife) e no terceiro foi usada apenas a população de Petrolina. Nas duas últimas alimentações, as populações foram alimentadas com os três sorotipos. Nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dpi, intestinos e glândulas salivares foram dissecados e testados por qRT-PCR para verificar a presença de vírus nos tecidos citados. O resultado da comparação entre os títulos dos três sorotipos usados no segundo e no terceiro experimento com *Ae. aegypti* através da análise do teste t de Student demonstrou que não existe diferença significativa entre eles ( $P = 0,5699$ ;  $P > 0,05$ ). Na tabela 4 estão resumidos os parâmetros usados nas infecções artificiais com DENV nas populações de *Ae. aegypti*, como o dia da coleta das células infectadas usadas nas alimentações e o título do sangue no momento da alimentação.

**Tabela 4** - Parâmetros usados nas infecções de *Aedes aegypti* com DENV1, DENV2 e DENV3.

	Dia de coleta das células infectadas usadas na infecção artificial *			Título do vírus no sangue (FFU/ml)		
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-1	DENV-2	DENV-3
1ª infecção	-	6	-	-	$2,0 \times 10^6$	-
2ª infecção**	4	5	5	$8,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	$5,25 \times 10^6$
3ª infecção**	4	5	5	$9,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$

\*Quantidade de dias decorridos desde a infecção do estoque de vírus em C6/36 até a visualização do efeito citopático.

\*\*  $P > 0,05$

Ao final do 21° dpi foram calculadas as taxas de infecção e disseminação de DENV nas populações de *Ae. aegypti*, que estão apresentadas na tabela 5 e descritas a seguir. As populações estudadas foram suscetíveis aos três sorotipos de DENV. No primeiro experimento com DENV-2, as taxas de infecção para as populações RecLab, Recife e Petrolina foram de 51%, 33% e 59%, respectivamente. As taxas de disseminação variaram de 33% a 100%, porém a totalidade das glândulas infectadas só foi observada nas populações de campo (Recife e Petrolina). Nos outros experimentos (2° e 3°), as taxas de infecção na RecLab foram de 2%, 4% e 14% para DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente. Considerando as populações de campo, as taxas de infecção de Recife foram de 6,25%, 4% e 24%, enquanto que na população Petrolina, as taxas de infecção foram de 8%, 6,25% e 14%,

para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente. As taxas de disseminação para RecLab foram de 0% (DENV-1), 100% (DENV-2) e 42% (DENV-3). Considerando as populações de campo, as taxas de disseminação da população de Recife foram de 33%, 50% e 83%, enquanto que para a população de Petrolina, 0%, 33% e 28% para DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente.

**Tabela 5.** Taxas de infecção e disseminação de DENV nas populações de *Ae. aegypti* ao final do 21º dia pós-infecção.

Sorotipo	Título (FFU/ml)	Taxa de Infecção (%)*			Taxa de Disseminação (%)**		
		RecLab	Recife	Petrolina	RecLab	Recife	Petrolina
DENV-1 (2º e 3º experimentos)	8,5 X 10 <sup>4</sup> 9,0 X 10 <sup>4</sup>	2	6,25	8	0	33	0
DENV-2 (1º experimento)	2,0 X 10 <sup>6</sup>	51	33	59	33	100	100
DENV-2 (2º e 3º experimentos)	7,5 X 10 <sup>4</sup> 1,5 X 10 <sup>5</sup>	4	4	6,25	100	50	33
DENV-3 (2º e 3º experimentos)	5,25 X 10 <sup>6</sup> 3,7 X 10 <sup>6</sup>	14	24	14	42	83	28

\*Quantidade de intestinos positivos dividida pelo número de mosquitos analisados

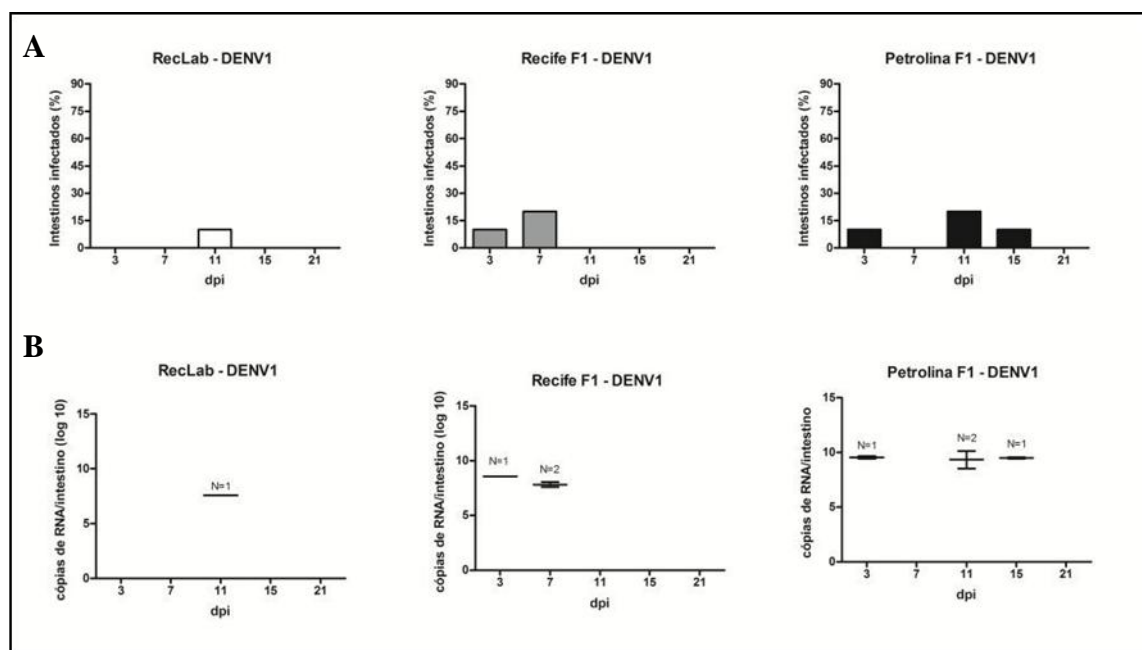
\*\* Quantidade de glândulas salivares positivas dividida pelo número de intestinos positivos

#### 7.4.1 Replicação e tropismo de DENV-1 em intestino e glândula salivar de populações de *Ae. aegypti*

Nesta infecção, a mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 4º dia pós-infecção em células C6/36) apresentava um título de 8,5 x 10<sup>4</sup> FFU/ml na infecção com RecLab e Recife e um título de 9,0 x 10<sup>4</sup> FFU/ml na infecção com Petrolina (Tabela 4). No 3º dpi, foram identificados intestinos infectados nas duas populações de campo (Recife e Petrolina) com taxas de infecção de 10%, não sendo, portanto, identificada a presença do vírus na colônia de laboratório (Reclab). No 7º dpi, intestinos positivos foram detectados na população de Recife com uma taxa de infecção de 20%, porém a partir do 11º dpi não foram mais detectados intestinos nessa população até o último momento analisado. Considerando a população de Petrolina, não foram detectados intestinos positivos no 7º dpi, no entanto, no

11º dpi os intestinos analisados apresentaram uma taxa de infecção de 20%, caindo para 10% no 15º dpi. No 21º dpi, não foi detectada a presença de intestinos infectados nessa população. Com relação à população RecLab, intestinos positivos foram detectados em um único momento (11º dpi), com uma taxa de infecção de 10%. Considerando o número de cópias de RNA viral quantificados por RT-PCR quantitativa nos intestinos positivos, houve uma variação de  $10^7$  a  $10^{10}$  cópias de RNA por intestino analisado (Figura 23), que foi estatisticamente significativa na população de Petrolina (ANOVA,  $P = 0,0247$ ;  $P < 0,05$ ).

**Figura 23** - Perfil de infecção por DENV1 em amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.

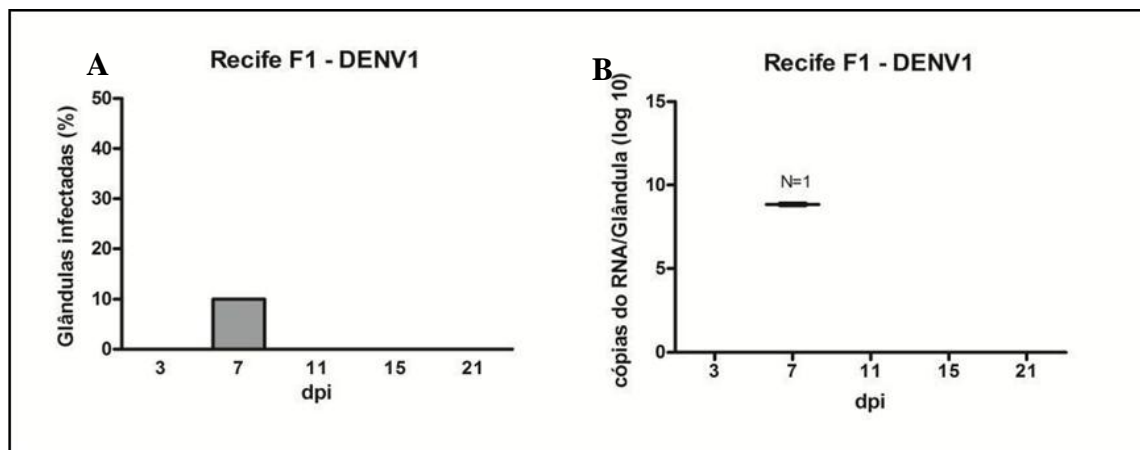


**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Com relação às glândulas salivares nas populações analisadas, foi detectada a presença de RNA viral em uma amostra da população de Recife no 7º dpi com, aproximadamente  $7 \times 10^8$  cópias de RNA (Figura 24).

**Figura 24** - Perfil de infecção por DENV1 em amostras de glândulas salivares da população de *Ae. aegypti* de campo (Recife) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



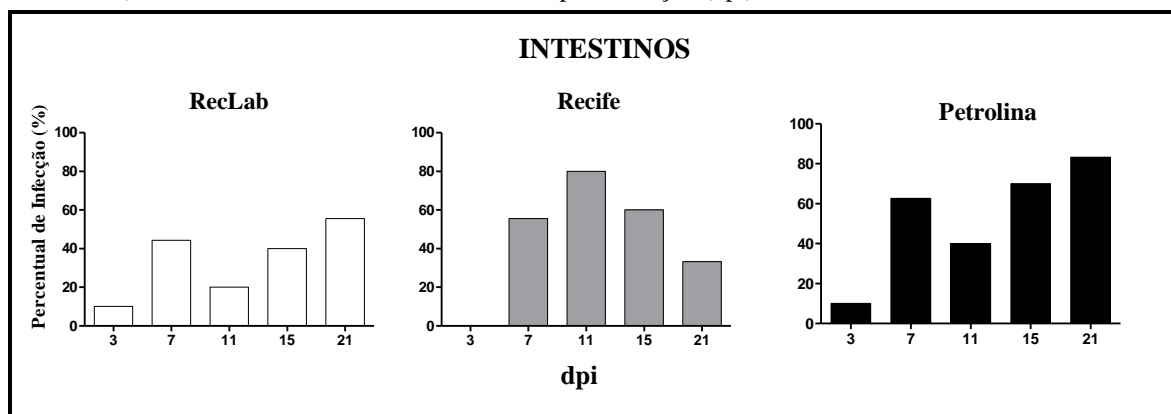
**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

#### 7.4.2 Replicação e tropismo de DENV-2 em intestino e glândula salivar de populações de *Ae. aegypti*

Para este sorotipo, foram realizadas duas infecções. Na primeira infecção, a mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 6º dia pós-infecção em células C6/36) apresentava um título de  $2,0 \times 10^6$  FFU/ml (Tabela 4). No 3º dpi, intestinos positivos foram detectados nas populações RecLab e Petrolina, ambas com taxa de infecção de 10%. A partir do 7º dpi, foram identificados intestinos positivos nas três populações em todos os momentos analisados. As populações RecLab e Petrolina apresentaram um padrão de infecção semelhante em todos os momentos analisados, com a maior taxa de infecção detectada no 21º dpi (Figura 25). Na população Recife, os intestinos positivos foram detectados a partir do 7º dpi e a maior taxa de infecção foi detectada no 11º dpi. A quantificação do número de cópias de RNA por intestino nas populações estudadas variou de  $10^5$  a  $10^{10}$  cópias de RNA por intestino analisado (Figura 26).

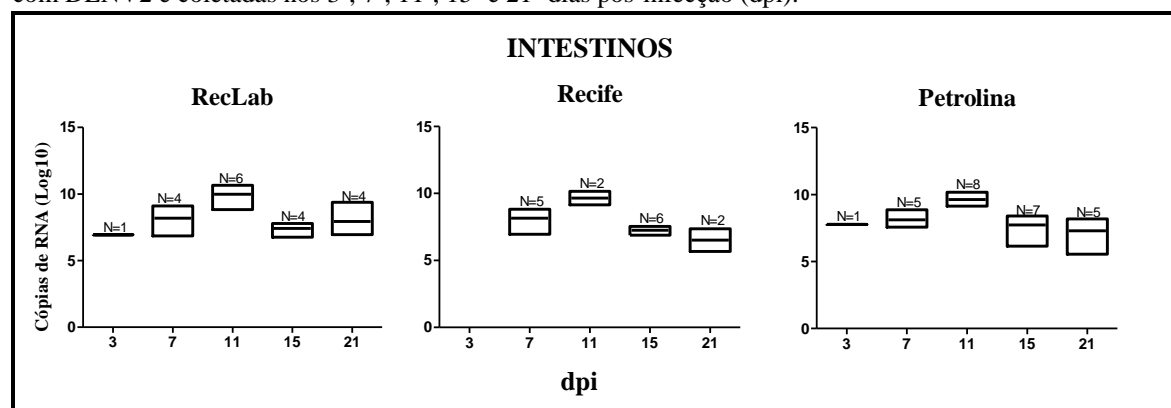
**Figura 25** - Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) por DENV2 em amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi).



**Fonte:** Carvalho-Leandro *et al.* (2012)

**Legenda:** Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. Resultados da 1ª infecção.

**Figura 26** - Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log<sub>10</sub>) de amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) infectados com DENV2 e coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi).



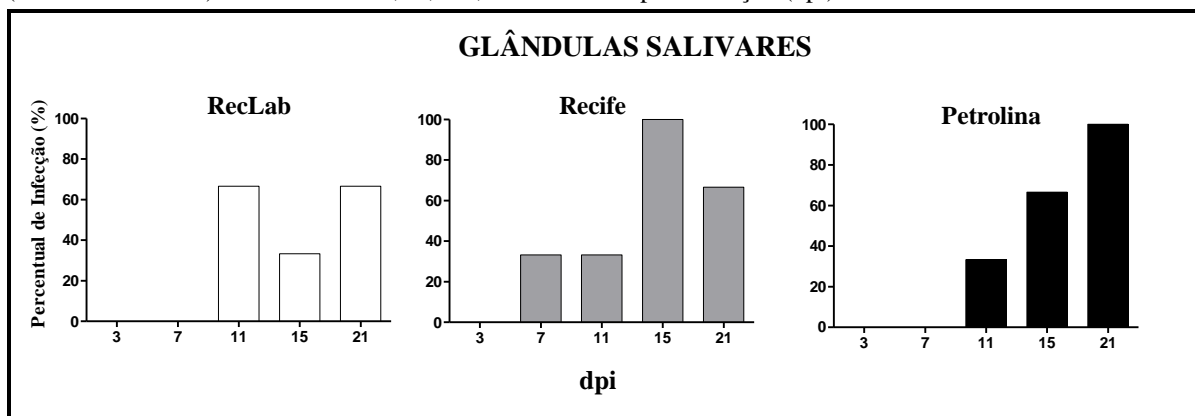
**Fonte:** Carvalho-Leandro *et al.* (2012)

**Legenda:** Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. Resultados da 1ª infecção.

Com relação às glândulas salivares, a presença do DENV-2 foi detectada pela primeira vez na população de Recife no 7º dpi. A partir do 11º dpi, todas as populações foram positivas para a presença do vírus na glândula salivar, com variações no percentual de infecção. No 15º dpi da população Recife, 100% das glândulas salivares estavam infectadas, porém no 21º dpi essa taxa de infecção caiu para 66,6%. Quanto à população de Petrolina, a taxa de infecção apresentou um padrão crescente de infecção com 100% das glândulas infectadas no 21º dpi. Na população RecLab, o DENV-2 foi detectado, pela primeira vez, no 11º dpi com uma taxa de infecção de 66,6% caindo para 33,3% no 15º dpi, e voltando a apresentar um aumento na taxa de infecção para 66,6% no 21º dpi (Figura 27).

O número de cópias do RNA viral neste órgão variou de  $10^5$  a  $10^{10}$  cópias, como apresentado na figura (Figura 28).

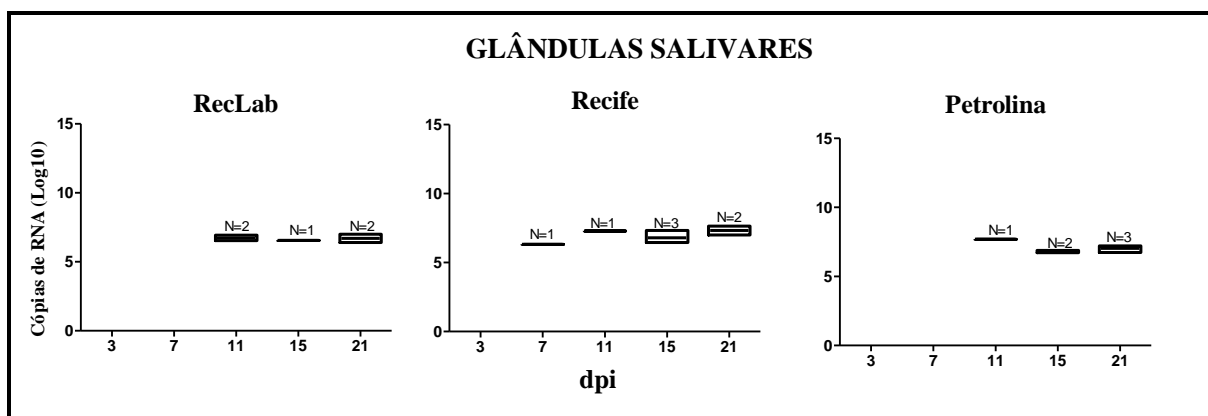
**Figura 27** - Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) por DENV2 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi).



**Fonte:** Carvalho-Leandro *et al.* (2012)

**Legenda:** Em cada momento foram analisados 3 *pools* contendo 3 glândulas por *pool*. Resultados da 1ª infecção.

**Figura 28** - Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10) de amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) infectados com DENV2 e coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi).



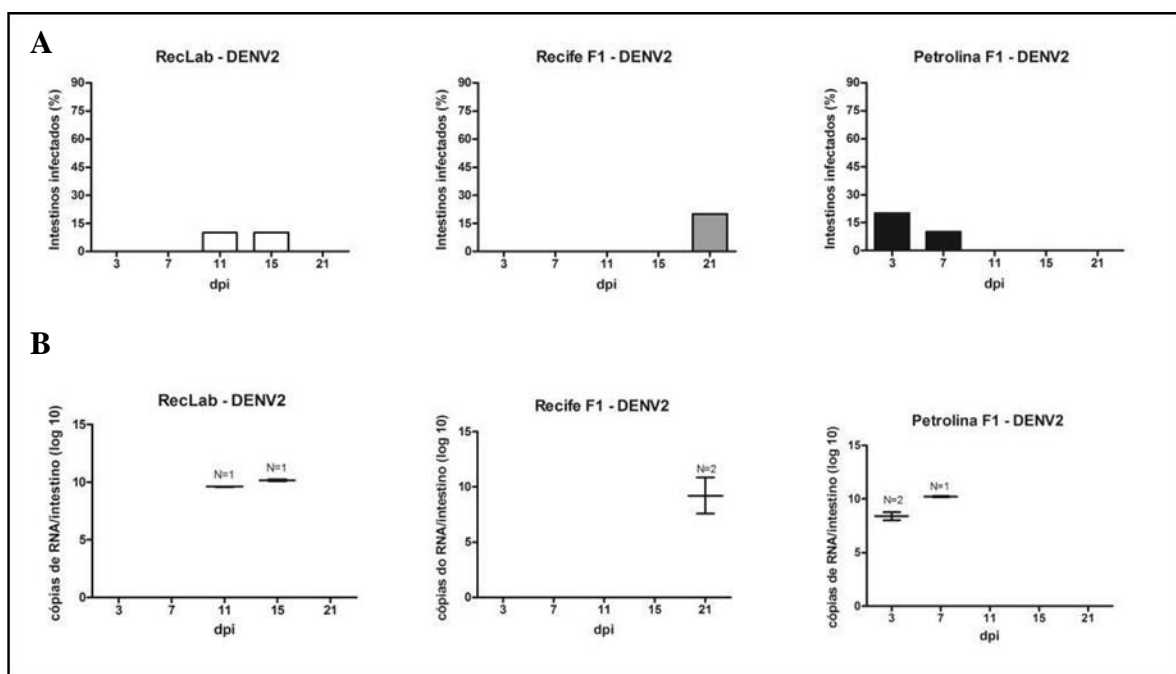
**Fonte:** Carvalho-Leandro *et al.* (2012)

**Legenda:** Em cada momento foram analisados 3 *pools* contendo 3 glândulas por *pool*. Resultados da 1ª infecção.

Na segunda infecção com o DENV-2, a mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 5° dia pós-infecção em células C6/36) apresentava um título de  $7,5 \times 10^4$  FFU/ml na infecção com RecLab e Recife e um título de  $1,5 \times 10^5$  FFU/ml na infecção com Petrolina (Tabela 4). Os primeiros intestinos infectados foram identificados nos 3° e 7° dpi na

população Petrolina. Após o 7º dpi, não foi mais detectado nenhum intestino positivo para DENV-2 nessa população. Na população RecLab, intestinos infectados foram detectados em dois momentos (11º e 15º dpi) ambos com taxa de infecção de 10%. Com relação à população Recife, intestinos positivos foram detectados em um único momento (21º dpi) com uma taxa de infecção de 20%. Considerando o número de cópias de RNA viral quantificados por qRT-PCR nos intestinos positivos, houve uma variação entre  $10^8$  e  $10^{10}$  cópias de RNA por intestino analisado (Figura 29).

**Figura 29** - Perfil de infecção por DENV2 em amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3º, 7º, 11º, 15º e 21º dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



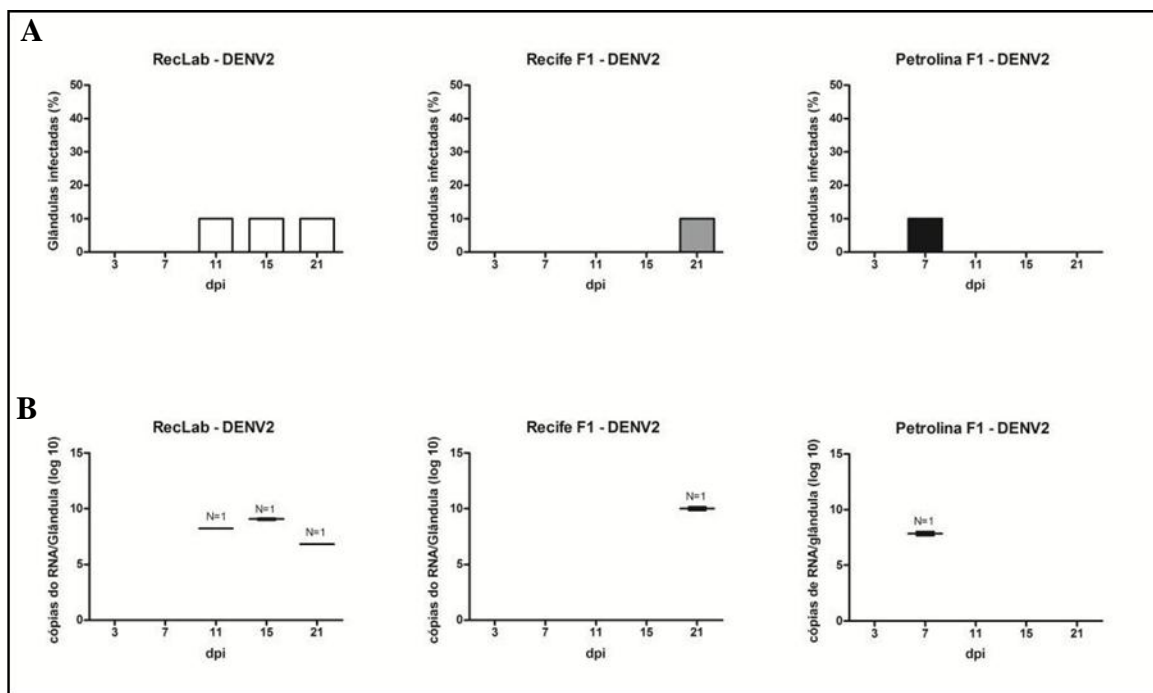
**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Com relação às glândulas salivares, amostras positivas foram identificadas, pela primeira vez, no 7º dpi em uma amostra (10%) da população Petrolina. A partir desse momento não foi detectada nenhuma outra amostra positiva nessa população. Na população RecLab, foram identificadas amostras positivas em três momentos (11º, 15º e 21º dpi) não havendo variação na taxa de infecção que foi de 10%. Na população Recife, foi detectada amostra positiva para DENV-2 em um único momento (21º dpi) com taxa de infecção de

10%. Quanto à quantificação da carga viral nas amostras positivas, o número de cópias do RNA viral variou entre  $10^7$  a  $10^{10}$  cópias de RNA por glândula analisada. (Figura 30).

**Figura 30** - Perfil de infecção por DENV2 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3°, 7°, 11°, 15° e 21° dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2ª infecção.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

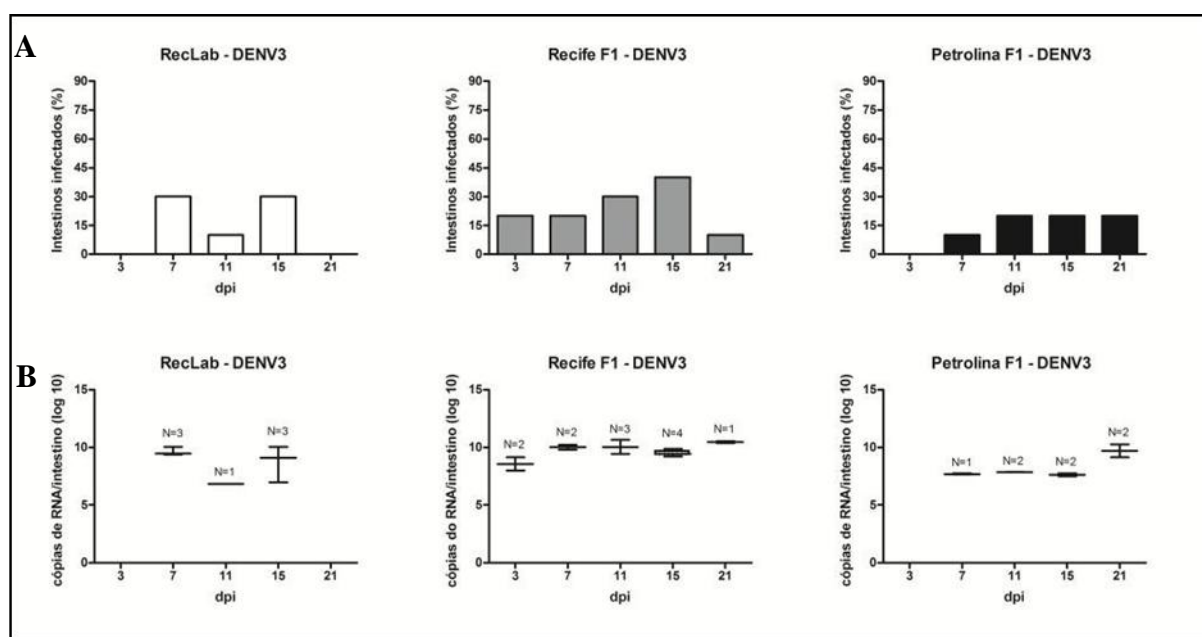
#### 7.4.3 Replicação e tropismo de DENV-3 em intestino e glândula salivar de populações de *Ae. aegypti*

Nessa infecção, a mistura de sangue e suspensão viral (coletada no 5º dia pós-infecção em células C6/36) apresentou um título de  $5,25 \times 10^6$  FFU/ml na infecção com RecLab e Recife e um título de  $3,7 \times 10^6$  FFU/ml na infecção com Petrolina (Tabela 4). No 3º dpi, intestinos infectados com DENV-3 foram detectados na população de Recife com uma taxa de infecção de 20% não sendo detectada nenhuma amostra positiva nas outras populações analisadas. Nos 7º, 11º e 15º dpi, intestinos infectados foram detectados nas três populações com variações nas taxas de infecção, exceto na população de Petrolina, que apresentou a mesma taxa de infecção de 20% em dois momentos analisados (11º e 15º dpi). No 21º dpi,



identifica-se ainda a presença de intestinos positivos nas populações de Recife e Petrolina com taxas de infecção de 10% e 20%, respectivamente, não sendo detectada, portanto, nenhuma amostra de intestino positiva na população RecLab. Considerando a quantificação da carga viral nos intestinos positivos, houve uma variação de  $10^6$  a  $10^{10}$  cópias de RNA por órgão analisado (Figura 31). A população de Petrolina apresentou uma variação estatisticamente significativa no número de cópias do RNA durante o PIE (ANOVA,  $P = 0,0405$ ;  $P < 0,05$ ).

**Figura 31** - Perfil de infecção por DENV3 em amostras de intestinos das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2<sup>a</sup> infecção.



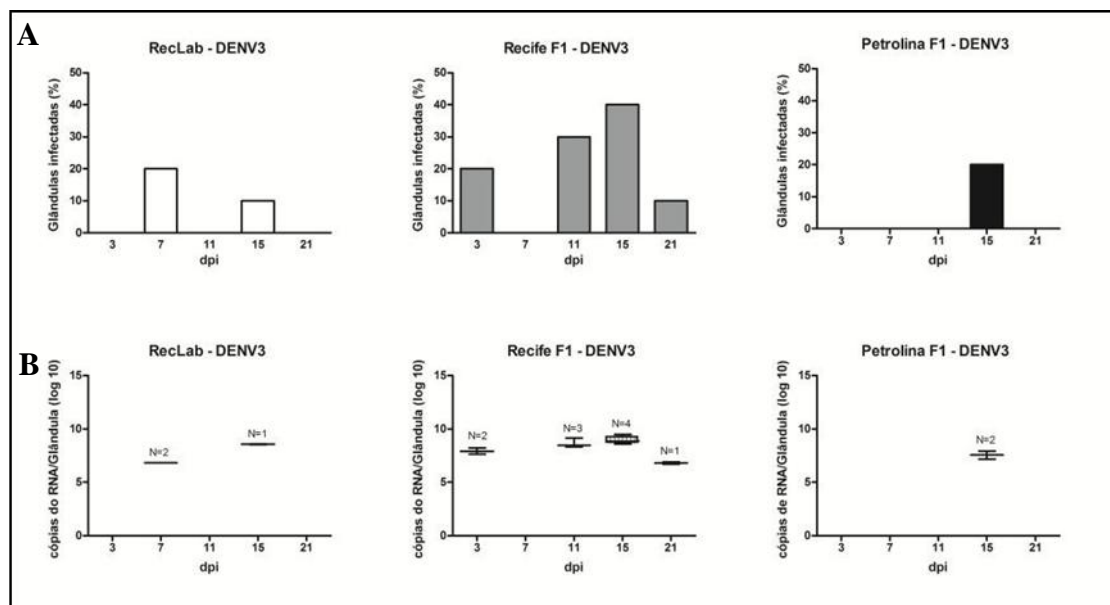
**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de intestinos positivos/número de intestinos analisados) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/intestino (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

Em relação às glândulas salivares, amostras positivas foram detectadas no 3<sup>o</sup> dpi na população de Recife, com taxa de infecção de 20%, porém no 7<sup>o</sup> dpi não foram detectadas amostras positivas nessa população. Do 11<sup>o</sup> dpi até o 21<sup>o</sup> dpi, amostras positivas para o DENV-3 foram detectadas, com variação nas taxas de infecção. Na população RecLab, foram detectadas amostras positivas em dois momentos com uma taxa de infecção de 20% no 7<sup>o</sup> dpi e 10% no 15<sup>o</sup> dpi. Na população Petrolina, amostras positivas foram detectadas apenas no 15<sup>o</sup> dpi com uma taxa de infecção de 20%. A quantificação das amostras positivas mostrou que o número de cópias de RNA por órgão variou de  $10^6$  a  $10^9$  cópias de RNA por órgão analisado,

sendo a população de Recife a única que apresentou uma variação estatisticamente significativa no número de cópias do RNA durante o PIE (ANOVA,  $P < 0,0001$ ) (Figura 32).

**Figura 32** - Perfil de infecção por DENV3 em amostras de glândulas salivares das populações de *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) e campo (Recife e Petrolina) coletadas nos 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias pós-infecção (dpi). Resultados da 2<sup>a</sup> infecção.



**Fonte:** Dados da autora.

**Legenda:** A) Percentual de infecção (número de glândulas positivas/número de glândulas analisadas) e B) Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/glândula (Log 10). Em cada momento foram analisados 8-10 mosquitos individualmente. N=quantidade de amostras positivas.

## 7.5 Detecção da taxa de infecção natural em amostras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

Considerando a espécie *Ae. aegypti*, dos 83 *pools* (301 espécimes) de mosquitos coletados diretamente nas casas, nove *pools* foram positivos para DENV, sendo cinco para DENV-1, dois para DENV-2 e dois para DENV-3. Nas residências onde foram coletados os mosquitos, posteriormente diagnosticados como positivo para DENV-3, as amostras coletadas dos pacientes também foram diagnosticadas como positivas para o mesmo sorotipo. Considerando os mosquitos provenientes de ovos coletados através das ovitrampas, dos 139 *pools* (2972 espécimes) testados, 17 foram diagnosticados positivos, sendo três para DENV-1, dez para DENV-2 e quatro para DENV-3. Os *pools* infectados com DENV-3 também foram coletados de residências onde os pacientes também foram diagnosticados com o mesmo sorotipo, o que não aconteceu com as amostras positivas para DENV-1 e DENV-2. A

taxa de infecção por DENV, expressa em MIR, foi de 29,9. No entanto, se considerarmos apenas os *pools* compostos por fêmeas, uma vez que não foram detectados *pools* positivos compostos por macho, a MIR sobe para 42,2. A MIR calculada para os *pools* de mosquitos provenientes de ovos foi de 6,0 (GUEDES *et al.*, 2010) (ANEXO).

Para *Ae. albopictus* foram coletados 270 mosquitos adultos resultando em um total de 34 *pools* analisados por RT-PCR. Destes *pools*, apenas uma amostra foi proveniente da Região Metropolitana do Recife, enquanto que as demais foram coletadas no município de Moreno. De todos os *pools* analisados nenhum foi positivo para DENV. Das amostras provenientes de ovos coletados na Região Metropolitana do Recife foram obtidos 187 mosquitos (100 fêmeas + 87 machos) resultando em 17 *pools*. Os resultados para o diagnóstico de dengue por RT-PCR mostraram que nenhum *pool* de *Ae. albopictus* foi positivo para a presença do vírus.

## 8 DISCUSSÃO

Este estudo representa o primeiro trabalho quantitativo e comparativo da competência vetorial de *Aedes* sp. a três sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2 e DENV-3). A competência vetorial é um dos fatores importantes para a compreensão do processo de interação vírus-vetor na transmissão das arboviroses. A avaliação dessa competência nas populações vetoras é importante, pois a presença de mosquitos competentes é essencial para a transmissão do vírus para a população humana não imune, aumentando, desta maneira, o risco de epidemias (COX *et al.*, 2011). São inúmeros os trabalhos que avaliam a competência vetorial dos mosquitos *Aedes* sp. ao DENV (BENNETT *et al.*, 2002; BOSIO *et al.*, 1998; COX *et al.*, 2011; DIALLO *et al.*, 2008; LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; MOUSSON *et al.*, 2002; MOUTAILLER *et al.*, 2009; PAUPY *et al.*, 2010; PESKO *et al.*, 2009; SYLLA *et al.*, 2009; TALBALAGHI *et al.*, 2010). No entanto, ainda são poucos aqueles que descrevem a cinética de replicação e disseminação dos diferentes sorotipos em *Aedes* sp. durante o período de incubação extrínseco (RICHARDSON *et al.*, 2006; SALAZAR *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010).

Em síntese, as populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes do estado de Pernambuco foram consideradas competentes para transmitir os três sorotipos de dengue. Além disso, foram observadas variações na competência aos três sorotipos quando comparamos os resultados observados entre as espécies e até mesmo entre populações dentro de cada espécie estudada. Os estudos sobre a estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* de Pernambuco mostraram que as populações estudadas apresentam variações no seu *background* genético (AYRES *et al.*, 2004; AYRES *et al.*, 2003; AYRES *et al.*, 2002) e na estrutura genética e que isto pode influenciar características importantes como a competência vetorial, conforme demonstrado em estudos prévios com populações de *Aedes* provenientes de outros estados brasileiros, México, Estados Unidos e Ilhas Caiman (BENNETT *et al.*, 2002; LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; 2004; PAUPY *et al.*, 2001).

Como a barreira de infecção do intestino pode afetar a competência vetorial, a taxa de infecção nesse órgão pelos três sorotipos de DENV foi avaliada e, como resultado, foi observado que as duas espécies apresentaram perfis diferentes. Com relação a *Ae. aegypti*, a taxa de infecção no intestino acumulada ao final do 21º dpi mostrou que as populações de campo (Recife e Petrolina) foram mais suscetíveis à infecção com o DENV-1 do que a colônia de laboratório (RecLab). No entanto, na infecção com DENV-2, a maior taxa de infecção foi encontrada na população de Petrolina e as populações RecLab e Recife

apresentaram a mesma taxa de infecção. Na infecção com DENV-3, a maior taxa de infecção foi encontrada na população de Recife e a RecLab apresentou a mesma taxa de infecção que a população de Petrolina. Se considerarmos a taxa de infecção por momento analisado, as populações de campo apresentaram uma maior variação na infecção com os três sorotipos quando comparadas à colônia de laboratório. Estudos prévios demonstraram que esta diferença no padrão de infecção entre populações de laboratório e campo pode ser decorrente do tempo de colonização das colônias de laboratório, o que poderia levar à seleção de alguns genes que desfavoreçam o processo de infecção (ALTO; REISKIND *et al.*, 2008; CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012; LAMBRECHTS *et al.*, 2010; SALAZAR *et al.*, 2007). Os resultados apresentados aqui corroboraram com esses estudos, pois a colônia de laboratório (RecLab), que vem sendo mantida no insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM por mais de 15 anos, foi inicialmente coletada em áreas do Recife. Além disso, as populações podem apresentar diferentes mecanismos de resposta à infecção por DENV. Em um estudo anterior, nosso grupo demonstrou que diferentes vias de resposta imune em *Ae. aegypti* podem ser desencadeadas em diferentes populações de mosquitos após a infecção com DENV. A expressão reduzida de moléculas envolvidas na resposta imune na população de campo infectada com DENV-2 sugere que o vírus poderia modular o sistema imune de *Ae. aegypti* com o objetivo de favorecer o processo de infecção nessas populações (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012). De fato, observando o padrão de infecção das populações de campo e laboratório, pode-se concluir que existe algum tipo de modulação da replicação viral na população de campo em comparação à linhagem de laboratório na tentativa de remover o patógeno. Isso acarretaria na quebra do paradigma de que uma vez o mosquito infectado, ele seria infectado por toda a vida. Para confirmar esses resultados serão necessários mais estudos. Embora ainda não esteja claro o papel das vias de resposta imune em determinar a competência vetorial, um estudo recente sobre a análise da expressão gênica dos genes envolvidos na infecção com dengue demonstrou evidências do envolvimento da via JAK-STAT no controle da infecção (BEHURA *et al.*, 2011).

Com relação à taxa de infecção acumulada nas duas populações de *Ae. albopictus* (laboratório e campo), a colônia de laboratório foi mais suscetível à infecção do que a população de campo, diferentemente do que ocorreu com a espécie *Ae. aegypti*. Estudos anteriores demonstraram que existe uma relação entre o número de gerações de populações de *Ae. albopictus* mantidas em laboratório e a taxa de infecção para DENV (LAMBRECHTS *et al.*, 2010; VAZEILLE *et al.*, 2003). Uma hipótese levantada por Lambrechts *et al.* (2010) que poderia explicar a diferença nas taxas de infecção entre as populações de laboratório e campo, além do número de gerações, seria a infecção natural de *Ae. albopictus* pela bactéria

endossimbionte *Wolbachia*. Hedges *et al.* (2008) sugeriram que a infecção desta espécie pela bactéria poderia induzir a uma proteção contra a infecção viral. Albuquerque *et al.* (2011) avaliaram a presença de *Wolbachia pipientis* na população de *Ae. albopictus* coletadas na Região Metropolitana do Recife e os resultados mostraram que a bactéria estava presente em 98% das amostras analisadas. Embora a população de laboratório não tenha sido testada quanto à infecção por *Wolbachia*, a colonização da colônia de laboratório pode ter resultado em uma diminuição ou perda da infecção pela bactéria que poderia ter influenciado na diminuição da proteção de *Ae. albopictus* contra a infecção com DENV (LAMBRECHTS *et al.*, 2010). Isto será investigado futuramente.

Um dos fatores que pode afetar a taxa de infecção por DENV no intestino e, conseqüentemente, a competência vetorial é a quantidade de vírus oferecida durante a alimentação sanguínea. Por isso, também foi avaliado nesse trabalho, o efeito do título de DENV usado na alimentação artificial sobre as taxas de infecção e disseminação nas populações de *Aedes* sp. Considerando a espécie *Ae. aegypti*, as diferenças encontradas entre a primeira infecção e as duas outras infecções com o DENV-2 podem ser devidas ao título de vírus no sangue usado nas alimentações. Na primeira alimentação com DENV-2, o título do sangue usado foi de  $2 \times 10^6$  FFU/ml, enquanto que nas outras alimentações, os títulos usados foram menores ( $7,5 \times 10^4$  e  $1,5 \times 10^5$ ;  $P > 0,05$ ). Como consequência disso, a taxa de infecção nos intestinos nas populações alimentadas com DENV-2 foi consideravelmente maior na primeira alimentação do que na segunda. Quanto à taxa de disseminação global, ao final dos cinco momentos analisados, ela não pode ser correlacionada com o título do vírus administrado na alimentação, o que corrobora com trabalhos anteriores (BENNETT *et al.*, 2002; BOSIO *et al.*, 1998), pois nas duas alimentações foi observada variação entre as taxas de disseminação, em torno de 33% a 100%. Quando a taxa de disseminação foi avaliada por dpi os resultados foram similares, por outro lado, a quantidade de glândulas salivares infectadas foi maior na primeira alimentação. Além disso, a presença de glândulas positivas nas populações de campo, durante a primeira alimentação, pode ser observada em quase todos os momentos diferentemente do que ocorreu na segunda alimentação, onde detectamos amostra positiva para glândula salivar em apenas um momento nas duas populações de campo. Isto sugere que o título viral usado nas alimentações sanguíneas pode influenciar a taxa de infecção dos vírus no intestino, no entanto, parece não ter influência na disseminação desses vírus para a glândula salivar.

Com relação às alimentações com DENV-1 e DENV-3, se compararmos a taxa global de infecção, a infecção com DENV-3 foi mais eficiente do que a infecção com o DENV-1. As variações nas taxas de infecção ocorridas nas populações podem ser decorrentes das

variações detectadas nas quantificações do RNA viral em cada momento analisado em virtude das diferenças dos títulos usados nas alimentações. Embora as amostras positivas não tenham sido tituladas, estudos com DENV-2 demonstram que existe uma correlação positiva entre o número de cópias de RNA viral e o título em PFU/ml do sangue ingerido (RICHARDSON *et al.*, 2006; SALAZAR *et al.*, 2007). Dessa maneira, quanto maior o número de cópias, maior o título e, conseqüentemente, maior a possibilidade de infecção no intestino, já que a taxa de infecção desse órgão é dose-dependente. Com relação a *Ae. albopictus*, as diferenças nas taxas de infecção para os três sorotipos podem ser decorrentes também das variações no número de cópias do RNA viral em cada momento analisado, devido ao aumento do título na 2ª alimentação. Com isso, foi possível observar um número maior de intestinos e glândulas infectadas em quase todos os momentos analisados, o que não ocorreu na primeira alimentação. As taxas de disseminação variaram de 20% a 100% nas duas alimentações, o que demonstra mais uma vez que a taxa de disseminação não é dose-dependente.

Estudos com os vírus Chikungunya e dengue demonstraram que a carga viral usada na infecção artificial pode ser um fator importante no processo de infecção de populações de mosquitos por esses vírus (DIALLO *et al.*, 2008; PESKO *et al.*, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2006; SALAZAR *et al.*, 2007; VAZEILLE *et al.*, 2007). Pesko *et al.* (2009) avaliaram a suscetibilidade dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes da Flórida ao vírus Chikungunya utilizando na infecção diferentes títulos virais. Os autores demonstraram que com altas doses do vírus ( $10^{5.2}$  e  $10^{6.1}$  PFU/ml), ambas as espécies foram suscetíveis à infecção viral. Quando os mosquitos foram infectados com baixas doses do vírus ( $10^{3.6}$  e  $10^{4.4}$  PFU/ml), apenas a espécie *Ae. albopictus* foi suscetível à infecção com o Chikungunya. Diallo *et al.* (2008) também atribuíram a baixa competência vetorial das populações de *Ae. aegypti* do Senegal ao DENV-2 ao baixo título usado na infecção artificial que foi de  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. É importante destacar que embora os títulos dos vírus usados nas alimentações realizadas no presente estudo tenham sido menores quando comparados a outros trabalhos sobre competência vetorial (BENNETT *et al.*, 2002; LOZANO-FUENTES *et al.*, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2006; SALAZAR *et al.*, 2007; SYLLA *et al.*, 2009), os valores estão dentro do valor observado em pacientes em estado de viremia, que pode variar de  $10^2$  a  $10^7$  PFU/ml ou  $10^3$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml (MURGUE *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2007; VAUGHN *et al.*, 2000). De qualquer maneira, apesar das baixas doses usadas nesse estudo, as duas populações de *Aedes* sp. apresentaram vírus na glândula salivar. O sucesso no processo de transmissão do vírus também pode estar relacionado à coevolução entre o genótipo do vírus e o genótipo do vetor (G x G) descrito por Lambrechts (2009). Os vírus usados na alimentação

artificial foram isolados de pacientes do Recife em epidemias anteriores e, desse modo, poderiam estar mais “adaptados” à população vetora, tornando-a mais permissiva à infecção e disseminação dos três sorotipos. É por essa razão que Salazar *et al.* (2007) ressaltam a importância do estudo de competência vetorial usando populações de campo e vírus isolados da mesma localidade a fim de evitar interpretações errôneas com relação ao potencial de transmissão da doença na área de estudo.

Considerando o título acima de  $10^5$  FFU/ml, o sorotipo 2 foi o mais eficiente em infectar e disseminar nos insetos das duas populações estudadas, porém estudos envolvendo co-infecção com dois ou mais sorotipos numa mesma alimentação sanguínea serão necessários para confirmar esta observação. O DENV-2 é um dos sorotipos mais bem estudados, provavelmente pela sua associação com as formas mais graves da doença (RICO-HESSE, 2003) resultante do seu alto poder de replicação. Estudos sobre replicação e disseminação de diferentes genótipos do DENV-2 demonstraram que o genótipo mais virulento (Sudeste Asiático), o qual circula atualmente em território brasileiro, infecta uma quantidade maior de mosquitos além de possuir um alto poder de disseminação para as glândulas salivares do que o genótipo menos virulento (Americano) (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2001; 2003; COLOGNA *et al.*, 2005). Embora o DENV-2 tenha se mostrado mais eficiente comparando-se as taxas de infecção e disseminação, existem outros fatores que podem contribuir para a transmissão da doença em uma determinada localidade, além da capacidade de replicação dos sorotipos na população vetora. Dentre esses fatores, podemos destacar o PIE dos vírus no vetor, o conhecimento sobre quais os sorotipos circulam nas populações dos possíveis vetores coletados em campo e a imunidade da população humana a um ou mais sorotipos.

Os resultados apresentados aqui indicam que também é importante reavaliar o atual modelo de análise da competência vetorial nas populações vetorais, que estima essa competência com base na identificação do vírus, ou de antígenos virais, em um único momento do PIE. Um trabalho recente discute que a forma de avaliar a competência vetorial em um único momento, pode levar a uma desvantagem dos outros sorotipos virais, ou de genótipos dentro de um mesmo sorotipo, que apresentaram uma baixa competência e isso poderia subestimar o real risco de transmissão da doença (CHRISTOFFERSON; MORES, 2011). Assim, além da competência vetorial, é importante avaliar para todos os sorotipos ou genótipos, em que momento do PIE são identificadas as primeiras glândulas salivares positivas. Um PIE curto para dengue pode trazer sérias consequências na transmissão da doença, pois uma vez infectado com dengue, os mosquitos serão capazes de transmitir o vírus a vida toda. Isto significa dizer que quanto menor o PIE, maior será o tempo que o vetor vai



ser capaz de transmitir o vírus para um hospedeiro sadio, aumentando assim as chances de transmissão da doença (SALAZAR *et al.*, 2007). Os resultados sobre a cinética da replicação do vírus nas populações aqui analisadas mostrou que o período de incubação extrínseco para as duas espécies infectadas com os três sorotipos foi menor do que os 8 – 14 dias descritos na literatura para infecções com DENV, exceto na população de Petrolina infectada com DENV-3 (HIGGS; BEATY, 2005; RICHARDSON *et al.*, 2006; SALAZAR *et al.*, 2007; SANCHEZ-VARGAS *et al.*, 2009). Apesar das populações de *Aedes* sp. apresentarem uma maior competência ao DENV-2, se analisarmos o PIE dos três sorotipos na população de *Ae. albopictus*, os resultados mostraram que os três sorotipos foram detectados na glândulas salivares das duas populações logo no 3º dpi e, como consequência, os três sorotipos apresentariam o mesmo risco de transmissão na população de campo. Por outro lado, se avaliarmos o risco de transmissão dos sorotipos nas populações de campo de *Ae. aegypti*, os dados sugerem que na população de Recife, o DENV-3 apresentaria o maior risco de transmissão por ter sido detectado logo no 3º dpi, seguido do DENV-2 e DENV-1 (detectados a partir do 7º dpi). Na população de Petrolina, o DENV-2 (detectado no 7º dpi) apresentaria uma maior chance de ser transmitido do que o DENV-3 (detectado no 15º dpi) e esta população seria considerada refratária ao DENV-1 já que não foram detectadas amostras positivas de glândula salivar para o sorotipo 1. Em alguns pontos analisados, tanto para intestino quanto para glândula salivar, houve uma descontinuidade na detecção de amostras positivas. Isto pode ser uma falha da técnica de qRT-PCR em detectar amostras com pouca quantidade de RNA viral, uma vez que as amostras são constituídas de órgãos que foram processados individualmente e não em *pools*. Os resultados sobre a detecção precoce de glândulas positivas reforça a necessidade de adotar estratégias de controle mais rápidas e eficientes que visem à remoção de ovos e adultos em tempo hábil com o objetivo de eliminar ou reduzir o contato da população vetora com a população humana não imune na tentativa de bloquear a dispersão viral diminuindo, assim, o risco de epidemias (REGIS *et al.*, 2009). A dengue é uma doença complexa e o risco de novas epidemias também vai depender, dentre outros fatores, do perfil imunológico da população humana.

Os resultados sobre a competência vetorial da população de *Ae. aegypti* para DENV coletada em Recife, que sugeriu uma competência maior dessas populações ao DENV-2, seguido do DENV-3 e DENV-1, corroboraram com os dados da vigilância entomológica realizada nas populações de *Ae. aegypti* coletadas na Região Metropolitana do Recife no período de Janeiro de 2005 a Junho de 2006 (GUEDES *et al.*, 2010). Nesse estudo, os resultados mostraram que os três sorotipos circulavam concomitantemente na população de mosquitos adultos e, pela primeira vez, foi demonstrada a presença dos três sorotipos nos

ovos de *Ae. aegypti*, sendo a maioria dos *pools* positivos para o DENV-2, seguido do DENV-3 e DENV-1. Este resultado é importante, pois demonstra a transmissão transovariana nessa população, o que pode contribuir para a permanência do vírus na natureza, mesmo nos períodos interepidêmicos. Os resultados mostraram que é importante incluir na vigilância entomológica de DENV a detecção dos sorotipos virais em mosquitos resultantes de formas imaturas coletadas em campo. Sendo assim, a presença de mosquitos infectados por transmissão transovariana poderá favorecer o aumento do risco de transmissão da doença por esta espécie, uma vez que não se faz necessária a alimentação em um hospedeiro infectado. Além disso, a transmissão transovariana representa um grande risco de introdução do vírus em áreas livres de dengue, em decorrência do transporte de ovos infectados.

É importante destacar que o monitoramento dos sorotipos circulantes nas populações vetoradas pode ser uma importante ferramenta para prever o potencial endêmico de uma localidade. No estado de Pernambuco, a circulação dos três sorotipos de DENV ocorre na população humana desde a introdução do DENV-3 em 2002. Este sorotipo foi predominante nas amostras humanas até 2006, embora uma porcentagem menor dessas amostras tenha sido positiva para DENV-1 e DENV-2. A partir de 2006, apesar do DENV-3 ainda ser o sorotipo mais frequentemente isolado no país, o monitoramento de casos na população humana identificou um número crescente de amostras positivas para o DENV-1 e DENV-2, o que corroborou com os resultados encontrados no monitoramento da população vetora que já havia detectado os dois sorotipos previamente mesmo em uma frequência baixa. A partir de 2008, houve um aumento no número de pacientes diagnosticados com DENV-2 e, em 2009, o DENV-2 e DENV-3 foram isolados em proporções semelhantes, sem o predomínio de um sorotipo. A partir de 2010, com a maioria da população humana imune ao DENV-3, casos com o isolamento de DENV-1 e DENV-2 foram diagnosticados com uma maior frequência. Apesar do predomínio do DENV-1 em 2011, é importante destacar a co-circulação dos sorotipos 2 e 4, o que faz necessário um alerta para a possibilidade da transmissão da doença em níveis elevados nos próximos anos (INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE, 2008; INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE, 2009; INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE, 2011).

Considerando as amostras de *Ae. albopictus*, não foi detectado nenhum *pool* positivo, apesar dos dados apresentados nesse trabalho demonstrarem que a espécie é competente aos três sorotipos estudados. Embora alguns estudos demonstrem que *Ae. albopictus* é mais competente em transmitir DENV do que *Ae. aegypti* em condições laboratoriais (MILLER; BALLINGER, 1988; ROSEN *et al.*, 1985), estudos recentes demonstram que, com relação às populações de campo, *Ae. aegypti* é mais competente do que *Ae. albopictus* (ALTO;

REISKIND et al., 2008; LAMBRECHTS et al., 2010; MOORE et al., 2007; PAUPY et al., 2010; VAZEILLE et al., 2003). Apesar da detecção de DENV em amostras de *Ae. albopictus* na população de Recife, o que sugere a capacidade dessa espécie em transmitir também DENV, o mosquito *Ae. aegypti* ainda é considerado o vetor primário da dengue. Isto demonstra a importância de outros fatores envolvidos na capacidade vetorial desta espécie, como grande abundância e maior antropofilia que são determinantes na implicação de *Ae. aegypti* como principal vetor da dengue.

Estudos sobre a interação vírus-vetor e competência vetorial tem sido cada vez mais frequentes em decorrência da grande necessidade de entender melhor a relação entre esses organismos. Os atuais métodos de controle de vetores têm apresentado falhas graves e estratégias mais eficientes para controlar os agentes infecciosos e seus vetores estão sendo buscadas. Sendo assim, este trabalho contribui para aumentar o corpo de conhecimentos que existe sobre os fatores que podem interferir na dinâmica de transmissão do vírus da dengue e poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias, que visem a redução da competência vetorial e conseqüentemente a transmissão do vírus, como a manipulação genética através do RNAi direcionada ao bloqueio da expressão de moléculas antivirais presentes no intestino ou nas glândulas salivares. Além disso, destaca-se também a importância de aprimorar novas estratégias baseadas em medidas que auxiliem o sistema de vigilância no bloqueio dessa transmissão em tempo hábil a fim de evitar o aumento de casos graves de dengue no país.

## 9 CONCLUSÕES

- a) As espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* provenientes da Região Metropolitana do Recife e de Petrolina são suscetíveis à infecção por DENV e *Ae. albopictus* é capaz de disseminar os três sorotipos para as glândulas salivares três dias após infecção;
- b) As duas espécies estudadas são mais permissivas à infecção com o sorotipo 2. Isso pode ocorrer devido ao alto poder de replicação desse sorotipo;
- c) O título do vírus usado na infecção artificial pode ser um fator relevante em estudos sobre competência vetorial;
- d) Existem variações no padrão de infecção nas espécies estudadas e dentro das populações analisadas de cada espécie;
- e) A eficiência de *Aedes aegypti* e de *Aedes albopictus* em transmitir os três sorotipos de dengue e o PIE curto identificado nessas espécies durante esse estudo reforça a necessidade de se devolver estratégias mais eficientes e mais rápidas visando o bloqueio da transmissão em tempo hábil a fim de evitar grandes epidemias no Estado.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. L. D. *et al.* High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipiensis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 773-776, Sep 2011.
- ALTO, B. W. *et al.* Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. Proceedings of the Royal Society of London - Series B - Biological sciences, London, v. 275, n. 1633, p. 463-471, Feb 22 2008.
- \_\_\_\_\_. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 79, n. 5, p. 688-695, Nov 2008.
- ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. Vector borne and zoonotic diseases, Larchmont, v. 1, n. 2, p. 159-168, Summer 2001.
- \_\_\_\_\_. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 68, n. 5, p. 539-544, May 2003.
- AYRES, C. E. *et al.* Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. Journal of the American Mosquito Control Association, Califórnia, v. 20, n. 4, p. 350-356, Dec 2004.
- AYRES, C. F. *et al.* Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 40, n. 4, p. 430-435, Jul 2003.
- \_\_\_\_\_. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 871-875, Sep 2002.
- BAE, H. G. *et al.* Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. Journal of virological methods, Netherlands, v. 110, n. 2, p. 185-191, Jun 30 2003.
- BALESTRA, R. A. *et al.* Occurrence of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) in urban area of Tocantins state, Brazil. Neotropical entomology, Londrina, v. 37, n. 2, p. 233-235, Mar./Apr. 2008.
- BEERNTSEN, B. T. *et al.* Genetics of mosquito vector competence. Microbiology and molecular biology reviews, Washington, v. 64, n. 1, p. 115-137, Mar 2000.
- BEHURA, S. K. *et al.* Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. PLoS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 5, n. 11, p. e1385, Nov 2011.

- BENEDICT, M. Q. *et al.* Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. Vector borne and zoonotic diseases, Larchmont, v. 7, n. 1, p. 76-85, Spring 2007.
- BENNETT, K. E. *et al.* Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 42, n. 2, p. 110-119, Mar 2005.
- \_\_\_\_\_. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 67, n. 1, p. 85-92, Jul 2002.
- BLACK, W. C. T. *et al.* Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Archives of medical research, Mexico, v. 33, n. 4, p. 379-388, Jul./Aug. 2002.
- BONILAURI, P. *et al.* Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 14, n. 5, p. 852-854, May 2008.
- BOOM, R. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar 1990.
- BOSIO, C. F. *et al.* Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 59, n. 6, p. 965-970, Dec 1998.
- \_\_\_\_\_. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics, Austin, v. 156, n. 2, p. 687-698, Oct 2000.
- CARVALHO-LEANDRO, D. *et al.* Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. Acta Trop, Submitted 2012.
- CECILIO, A. B. *et al.* Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. Brazilian journal of biology, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 123-127, Feb 2009.
- CHIEN, L. J. *et al.* Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. Journal of clinical microbiology Washington, v. 44, n. 4, p. 1295-1304, Apr 2006.
- CHOW, V. T. *et al.* Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. The american journal of tropical medicine and hygiene, v. 58, n. 5, p. 578-586, May 1998.
- CHRISTOFFERSON, R. C.; MORES, C. N. Estimating the magnitude and direction of altered arbovirus transmission due to viral phenotype. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 1, p. e16298, 2011.
- COLOGNA, R. *et al.* Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. Journal of virology, Washington, v. 79, n. 2, p. 853-859, Jan 2005.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENCO DE OLIVEIRA, R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

CORDEIRO, M. T. *et al.* Vinte anos de evolução da dengue no Estado de Pernambuco. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2008.

COX, J. *et al.* Variation in vector competence for dengue viruses does not depend on mosquito midgut binding affinity. PLoS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e1172, May 2011.

DAS, S. *et al.* Protocol for dengue infections in mosquitoes (*A. aegypti*) and infection phenotype determination. Journal of visualized experiments, Boston, n. 5, p. 220, 2007.

DEROUICH, M. *et al.* A model of dengue fever. Biomedical engineering online, London, v. 2, p. 4, Feb 19 2003.

DIALLO, M. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 102, n. 5, p. 493-498, May 2008.

EFFLER, P. V. *et al.* Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 11, n. 5, p. 742-749, May 2005.

FAY, R.; PERRY, S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. Mosquito News, v. 25, p. 8, 1965.

FERNANDEZ, Z. *et al.* Vector competence of rural and urban strains of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) from Sao Paulo State, Brazil for IC, ID, and IF subtypes of Venezuelan equine encephalitis virus. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 40, n. 4, p. 522-527, Jul 2003.

FIELD, V. *et al.* Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. BMC infectious diseases, London, v. 10, p. 330, 2010.

FORATTINI, O. P. Identification of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) in Brazil. Revista de saúde pública, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 244-245, Jun 1986.

GARCIA-REJON, J. *et al.* Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 79, n. 6, p. 940-950, Dec 2008.

GIROD, R. *et al.* High susceptibility to Chikungunya virus of *Aedes aegypti* from the French West Indies and French Guiana. Tropical medicine & international health, Oxford, v. 16, n. 1, p. 134-139, Jan 2011.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Medical and veterinary entomology, Oxford, v. 18, n. 3, p. 215-227, Sep 2004.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical microbiology reviews, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, Jul 1998.

\_\_\_\_\_. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. Novartis Found Symp, v. 277, p. 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253, 2006.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 1, n. 2, p. 55-57, Apr-Jun 1995.

GUEDES, D. R. *et al.* Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. Journal of vector borne diseases, Delhi, v. 47, n. 2, p. 67-75, Jun 2010.

GUEDES, D. R. D. Epidemiologia Molecular do *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

GUNTHER, J. *et al.* Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. Intervirology, Intervirology, v. 50, n. 5, p. 347-352, 2007.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. Annual review of entomology, Palo Alto, v. 53, p. 273-291, 2007.

HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association (Supplement) Fresno CA, v. 1, p. 1-39, Dec 1988.

HAWLEY, W. A. *et al.* Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 26, n. 2, p. 122-129, Mar 1989.

HEDGES, L. M. *et al.* Wolbachia and virus protection in insects. Science, v. 322, n. 5902, p. 702, Oct 31 2008.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 3, n. 4, p. 376-396, Oct 1990.

HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). Biology of disease vectors. Waltham: Elsevier Academic, 2005. p. 167-185

INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: <<http://www.combateadengue.com.br/wp-content/uploads/2009/02/boletim-janeiro-novembro-2008.pdf>>. Acesso em: 20 Jan. 2010.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_epidemiologico\\_semana\\_1a52\\_09\\_revisado.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf)>. Acesso em: 20 Jan. 2010.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_2011\\_37\\_39.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf)>. Acesso em: 20 Fev. 2012.

KEMPF, B. J. *et al.* Quantitative analysis of La Crosse virus transcription and replication in cell cultures and mosquitoes. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 74, n. 2, p. 224-232, Feb 2006.



KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fields Virology. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KOH, B. K. *et al.* The 2005 dengue epidemic in Singapore: epidemiology, prevention and control. Annals of the Academy of Medicine, Singapore, Singapore, v. 37, n. 7, p. 538-545, Jul 2008.

KONG, Y. Y. *et al.* Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. Journal of virological methods, Amsterdam, v. 138, n. 1-2, p. 123-130, Dec 2006.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. Clinical microbiology reviews, Washington, v. 18, n. 4, p. 608-637, Oct 2005.

LA RUCHE, G. *et al.* First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. Euro surveillance, Saint-Maurice, v. 15, n. 39, p. 19676, Sep 30 2010.

LAI, Y. L. *et al.* Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for Dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. Journal of clinical microbiology Washington, v. 45, n. 3, p. 935-941, Mar 2007.

LAMBRECHTS, L. *et al.* Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. BMC evolutionary biology, London, v. 9, p. 160, 2009.

\_\_\_\_\_. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 4, n. 5, p. e646, 2010.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 30, n. 3, p. 545-551, Mar 1992.

LIMA-CAMARA, T. N. D. *et al.* [Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil]. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2079-2084, Oct 2006.

LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. *et al.* 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. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 69, n. 1, p. 105-114, Jul 2003.

\_\_\_\_\_. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 98, n. 1, p. 43-54, Jan 2004.

LOZANO-FUENTES, S. *et al.* The Neovolcanic Axis Is a Barrier to Gene Flow among *Aedes aegypti* Populations in Mexico That Differ in Vector Competence for Dengue 2 Virus. PLoS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 3, n. 6, p. e468, 2009.

MARQUARDT, W. C. Biology of disease vectors. 2nd. ed.: Academic press (st), 2004.

MARTINS, V. E. *et al.* First report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in the state of Ceara, Brazil. Revista de Saude Publica, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 737-739, Aug 2006.

MILLER, B. R.; BALLINGER, M. E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 82, n. 3, p. 476-477, 1988.

MITCHELL, C. J. The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. Parassitologia, Roma, v. 37, n. 2-3, p. 109-113, Dec 1995.

MOORE, P. R. *et al.* Infection and dissemination of dengue virus type 2 in *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes scutellaris* from the Torres Strait, Australia. Journal of the American Mosquito Control Association Fresno CA, v. 23, n. 4, p. 383-388, Dec 2007.

MORENS, D. M. *et al.* Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 22, n. 2, p. 250-254, Aug 1985.

MOUSSON, L. *et al.* Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Chiang Mai (Thailand) and relation with dengue transmission. Tropical medicine and international health, Oxford, v. 7, n. 10, p. 865-872, Oct 2002.

MOUTAILLER, S. *et al.* Recently introduced *Aedes albopictus* in Corsica is competent to Chikungunya virus and in a lesser extent to dengue virus. Tropical medicine and international health, Oxford, v. 14, n. 9, p. 1105-1109, Sep 2009.

MURGUE, B. *et al.* Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. Journal of Medical Virology Honolulu, v. 60, n. 4, p. 432-438, Apr 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Strengthening the implementation of the global strategy for dengue fever/dengue hemorrhagic fever prevention and control, Genève, 2000.

PAGES, F. *et al.* *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. PLoS One, San Francisco, v. 4, n. 3, p. e4691, 2009.

PAUPY, C. *et al.* *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. Microbes and infection, Paris, v. 11, n. 14-15, p. 1177-1185, May 18 2009.

\_\_\_\_\_. Population structure of *Aedes albopictus* from La Reunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus. Heredity, Edinburgh, v. 87, n. Pt 3, p. 273-283, Sep 2001.

\_\_\_\_\_. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. Vector borne and zoonotic diseases, v. 10, n. 3, p. 259-266, Apr 2010.

PESKO, K. *et al.* Effects of infectious virus dose and bloodmeal delivery method on susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to chikungunya virus. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 46, n. 2, p. 395-399, Mar 2009.

PESSANHA, J. E. *et al.* Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 44, n. 1, p. 103-105, Jan-Feb 2011.

REGIS, L. *et al.* Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 50-59, Feb 2008.

\_\_\_\_\_. An entomological surveillance system based on open spatial information for participative dengue control. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 655-662, Dec 2009.

REITER, P. *et al.* *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? The Lancet infectious diseases, New York, v. 6, n. 8, p. 463-464, Aug 2006.

RICHARDSON, J. *et al.* Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 74, n. 1, p. 132-141, Jan 2006.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. Advances in virus research, New York, v. 59, p. 315-341, 2003.

ROSEN, L. *et al.* Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 34, n. 3, p. 603-615, May 1985.

SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiology, London, v. 7, p. 9, 2007.

SANCHEZ-VARGAS, I. *et al.* Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. PLoS pathogens, San Francisco, v. 5, n. 2, p. e1000299, Feb 2009.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil by year 2000. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95 Suppl 1, p. 179-181, 2000.

SHU, P. Y. *et al.* Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 6, p. 2408-2416, Jun 2003.

SOUZA, L. J. D. Dengue - Diagnóstico, Tratamento e Prevenção. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007.

SYLLA, M. *et al.* Gene Flow, Subspecies Composition, and Dengue Virus-2 Susceptibility among *Aedes aegypti* Collections in Senegal. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 3, n. 4, p. e408, 2009.

TALBALAGHI, A. *et al.* Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? Medical and veterinary entomology, Oxford, v. 24, n. 1, p. 83-87, Mar 2010.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Diagnosis and management of dengue. BMJ, v. 339, p. b4338, 2009.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Informe epidemiológico do SUS, Brasília, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEMPORAO, J. G. *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 938-940, May 2011.

THENMOZHI, V. *et al.* Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a southern Indian state. Japanese journal of infectious diseases, Tokyo, v. 60, n. 5, p. 245-249, Sep 2007.

URDANETA, L. *et al.* Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. Infection, genetics and evolution, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 177-184, Mar 2005.

VAN DEN HURK, A. F. *et al.* Vector Competence of Australian Mosquitoes for Chikungunya Virus. Vector borne and zoonotic diseases, Larchmont, Oct 30 2009.

VANLANDINGHAM, D. L. *et al.* Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction quantification of West Nile virus transmitted by *Culex pipiens quinquefasciatus*. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 71, n. 1, p. 120-123, Jul 2004.

VAUGHN, D. W. *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. Journal of infectious diseases, Chicago, v. 181, n. 1, p. 2-9, Jan 2000.

VAZEILLE, M. *et al.* Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 65, n. 5, p. 491-497, Nov 2001.

\_\_\_\_\_. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. PLoS One, San Francisco, v. 2, n. 11, p. e1168, 2007.

\_\_\_\_\_. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 68, n. 2, p. 203-208, Feb 2003.

WYMANN, M. N. *et al.* Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) - a threat for Switzerland? Euro surveillance, Saint-Maurice, v. 13, n. 10, Mar 6 2008.

ZHANG, M. *et al.* Quantitative analysis of replication and tropisms of Dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 83, n. 3, p. 700-707, Sep 2010.

---

## **APÊNDICE A – Artigo1**

## Research Articles

# Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil

D.R.D. Guedes<sup>a</sup>, M.T. Cordeiro<sup>b,c</sup>, M.A.V. Melo-Santos<sup>a</sup>, T. Magalhaes<sup>a</sup>, E. Marques<sup>b</sup>, L. Regis<sup>a</sup>, A.F. Furtado<sup>b</sup> & C.F.J. Ayres<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ), Av. Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife PE, Brazil; <sup>b</sup>Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, CPqAM/FIOCRUZ; <sup>c</sup>Laboratório Central, Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. Rua Fernandes Vieira s/n, Boa Vista, Recife PE, Brazil

### Abstract

**Background & objectives:** Dengue is currently one of the most important arthropod-borne diseases and may be caused by four different dengue virus serotypes (DENV-1 to DENV-4), transmitted mainly by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. With the lack of a dengue vaccine, vector control strategies constitute a crucial mode to prevent or reduce disease transmission. In this context, DENV detection in natural *Ae. aegypti* populations may serve as a potential additional tool for early prediction systems of dengue outbreaks, leading to an intensification of vector control measures, aimed at reducing disease transmission. In Brazil, this type of surveillance has been performed sporadically by a few groups and has not been incorporated as a routine activity in control programs. This study aimed at detecting DENV in natural *Ae. aegypti* from Recife, Pernambuco, to check the circulating serotypes and the occurrence of transovarial transmission in local mosquito populations.

**Methods:** From January 2005 to June 2006, mosquitoes (adults and eggs) were collected in houses where people with clinical suspicion of dengue infection lived at. RNA was extracted from pooled mosquitoes and RT-PCR was performed in these samples for detection of the four DENV serotypes.

**Results & conclusion:** Out of 83 pools of adult mosquitoes collected in the field, nine were positive for DENV: five for DENV-1, two for DENV-2 and two for DENV-3. From 139 pools of adult mosquitoes reared from collected eggs, there were 17 positive pools: three for DENV-1, 10 for DENV-2, and four for DENV-3. These results are discussed in the paper in regard to the local dengue epidemiological data. The conclusions clearly point to the informative power and sensitivity of DENV entomological surveillance and to the importance of including mosquito immature forms in this strategy.

**Key words** Arbovirus; entomological surveillance; mosquito; RT-PCR; vertical transmission

### Introduction

Dengue fever is one of the most important arthropod-borne diseases and may be caused by four dengue virus serotypes (DENV-1 to DENV-4), belonging to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*<sup>1</sup>. An

estimated 2.5 billion people living in tropical and subtropical areas, distributed within 100 countries are at risk of epidemic dengue virus transmission. Annually, more than 100 million cases of classic dengue fever and around 450,000 cases of dengue hemorrhagic fever are notified<sup>2</sup>.

In Brazil, since the introduction of DENV-1 in the state of Rio de Janeiro in 1986, more than 2.7 million dengue cases and nearly 2090 dengue hemorrhagic/dengue shock syndrome cases were reported in the country until 2002<sup>3</sup>. In the State of Pernambuco (north-east Brazil), over 30,000 cases of dengue disease were reported from 2005 to 2006<sup>4-5</sup>. In 2008, the Brazilian Ministry of Health reported >230,000 dengue cases in the country from January to April. Despite a decrease in approximately 11% of case numbers compared to the same period in 2007, the proportion of severe dengue cases increased<sup>6</sup>, probably due to the circulation of multiple serotypes. With the lack of a commercial dengue vaccine, prevention/contention of dengue outbreaks depends on the surveillance of clinical cases, and very importantly on vector control.

*Aedes aegypti* (Linnaeus) is a widely distributed mosquito and the main urban vector involved in dengue virus transmission throughout the world, including Brazil. Demographic and social changes including unplanned urbanization, increasing population size, as well as ineffective mosquito control measures in most dengue endemic regions of the world have contributed to broaden the geographical distribution of this mosquito species<sup>7</sup>. Detection of dengue virus in natural *Aedes* populations has shown to be a potential additional tool for early prediction systems of dengue outbreaks<sup>8-10</sup>. In one of these studies, DENV were detected in field mosquitoes at 6–8 wk before

dengue cases in the human population were apparent<sup>8</sup>. Early detection of infected mosquitoes could lead to intensification of vector control measures, aiming at reducing disease transmission<sup>8,11</sup>. In Brazil, monitoring of dengue virus serotypes circulating in *Aedes* spp has been performed sporadically by a few groups<sup>11-14</sup>, and has not been incorporated as a routine activity in control programs. Moreover, only a few of these studies attempted to include *Ae. aegypti* immature forms in the surveillance.

The present study aimed at detecting, through RT-PCR, the presence of DENV serotypes circulating in *Ae. aegypti* collected in several districts of Recife, the capital of the state of Pernambuco. For that, mosquito collections were performed in places where patients with clinical diagnostic of dengue lived at. Besides adults, mosquito eggs were also collected, in order to check if natural vertical transmission was occurring in these populations. Results obtained in the study are discussed in regard to the local dengue epidemiological data.

## Material & Methods

**Mosquito collections:** *Ae. aegypti* mosquitoes were collected in 70 residences inhabited by individuals with clinical diagnostic of dengue from January 2005 to June 2006. These houses were scattered throughout 25 out of 94 neighbourhoods of Recife (Fig. 1), a city located at 8.05S, 34.88W. Diagnostic of den-

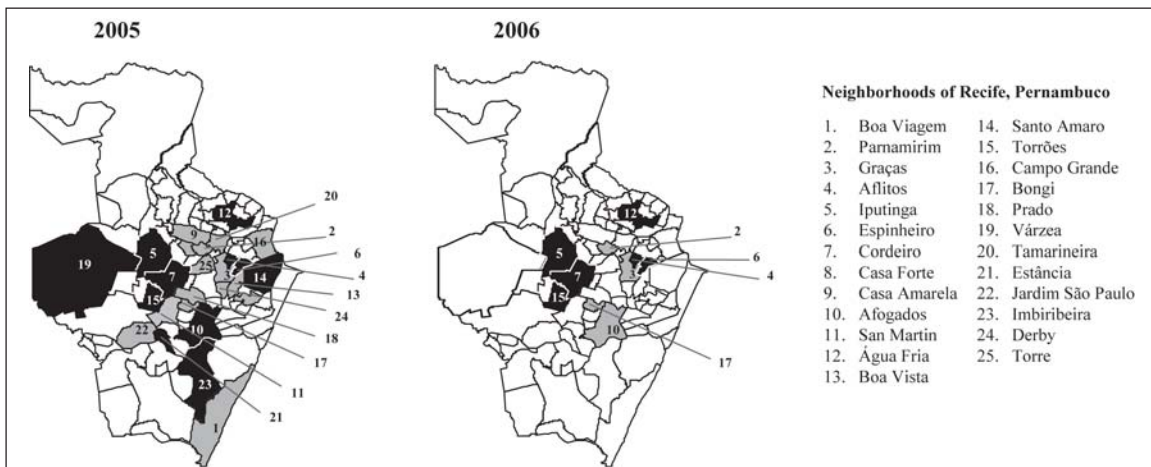


Fig. 1: Map of Recife showing areas where mosquitoes were collected (grey and black) and where positive pools originated from (black) in 2005 and 2006

gue cases were confirmed by RT-PCR, viral isolation and serology at the Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) at Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ<sup>15</sup>. Only those who agreed to participate in this study were included, after signing a proper Informed Consent Form, approved by the Brazilian Ethics Committee (CAAE 25000.119007/2002-03). Mosquitoes were collected between 1 and 30 days after notification of a suspected dengue case.

Adult mosquitoes were captured indoors in resting places, using a battery-operated backpack aspirator (modified CDC backpack aspirator, Model 1412). Live adult mosquitoes were anaesthetized at 4°C, morphologically identified, sorted by species, locality and sex, pooled (1–9 individuals/pool) and preserved at –80°C until tested.

Eggs were collected through ovitraps based on Fay and Perry<sup>16</sup> model. Traps were placed outdoors for seven days in the same residences where adults were collected. Eggs were counted and each batch was placed in individual containers with water for larval eclosion, which were identified according to place and date of collection. Newly hatched larvae were reared to adults under laboratory conditions (temperature of 26 ± 2°C; relative humidity 60–80%; 12/12 h L/D). Emerged adult mosquitoes were maintained on water and 10% sugar solution. Seven days after emergence, adults were identified to species and pooled (15–28 individuals/pool, except for one pool with 2 mosquitoes only) by date and place of collection. These pools were composed of males and females. Samples were kept at –80°C until used in the experiments.

*Dengue virus detection through reverse-transcription PCR (RT-PCR):* Mosquito pools were homogenized with a pestle in Leibowitz medium (L-15) supplemented with Fetal Bovine Serum 2% (FBS), Penicillin-Streptomycin (1%) and Fungizone (1%). Viral RNA was extracted from these samples using a silica method described previously<sup>17</sup>, with minor modifications. Before carrying out reverse transcription and semi-nested PCR reactions, RNAs were

treated with recombinant DNase I (Invitrogen) to ensure total elimination of genomic DNA. RT-PCR for detecting and classifying DENV in mosquito pools was performed according to Lanciotti *et al*<sup>18</sup>. Briefly, the first step of RT-PCR consisted of a reverse transcription reaction to synthesize cDNA from RNA templates, followed by amplification of a 511 bp region between genes C and PrM of DENV with primers D1 (forward) and D2 (reverse). The second step of the semi-nested PCR was carried out with D1 and TS1, TS2, TS3 and TS4 as reverse primers, which amplify regions of 482, 119, 290 and 392 bp of DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4, respectively. Primers sequences used were:

D1– 5'TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-3';  
 D2– 5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3';  
 TS1 – 5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3';  
 TS2 – 5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3';  
 TS3 – 5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3';  
 TS4 – 5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'.

*Minimum infection rate (MIR):* The MIR of DENV in captured adults and adults reared from collected eggs was calculated as: (number of positive pools for DENV/total number of mosquitoes tested) × 1000<sup>8</sup>.

## Results

*Mosquito collections:* Mosquito collections using an aspirator revealed the presence of *Culex quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* and *Aedes albopictus*, where the first two species were more abundant than the latter. Only *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were collected in ovitraps (placed outdoors), with a higher frequency of the first over the second.

The number of captured adults was substantially lower than that of adults emerged from collected eggs. A total of 83 pools (301 specimens) of field-caught *Ae. aegypti* adults and 139 pools (2972 specimens) of adults reared from eggs were assayed by RT-PCR for DENV detection (Table 1). In houses where adult mosquitoes were captured, the number of specimens varied from 1 to 60, whereas the number



**Table 1. Collection of *Aedes aegypti* in houses of patients with suspicion of dengue, and dengue virus (DENV) serotypes detected in mosquito pools through RT-PCR**

Locality <sup>a</sup>	Number of houses visited for mosquito collection (confirmed human dengue cases) <sup>b</sup>	Adult <i>Ae. aegypti</i> captured in the field (pools assayed for DENV detection) <sup>c</sup>		DENV detected in mosquito pools (DENV in patient) <sup>d</sup>		Adult <i>Ae. aegypti</i> reared from collected eggs (pools assayed for DENV detection) <sup>e</sup>	DENV detected in mosquito pools (DENV in patient) <sup>f</sup>		
		M	F	2005	2006		(M & F)	2005	2006
		Boa Viagem	8 (3)	5 (3)	2 (1)		–	–	390 (16)
Parnamirim	6 (4)	26 (8)	20 (4)	–	–	110 (6)	–	–	
Graças	6 (4)	11 (4)	3 (2)	–	–	88 (5)	–	–	
Iputinga	4 (1)	4 (1)	–	–	D1 (Neg)	77 (5)	–	D2 (D3)	
Espinheiro	4 (1)	11 (5)	7 (2)	D1 (Neg)	–	156 (9)	–	D2, D2, D2, D2 (D3)	
Boa Vista	2 (1)	14 (2)	2 (1)	–	–	113 (5)	–	–	
Cordeiro	4 (1)	4 (2)	1 (1)	–	D1 (Neg)	259 (10)	D1 (Neg)	D2, D2 (Neg)	
Casa Amarela	3 (1)	5 (2)	1 (1)	–	–	25 (3)	–	–	
Várzea	1 (1)	–	–	–	–	228 (8)D1 (D3)	–	–	
Imbiribeira	1 (0)	5 (1)	3 (1)	–	–	70 (4)	–	–	
Tamarineira	1 (1)	3 (2)	–	–	–	71 (3)	D3	(D3)	
Aflitos	4 (2)	57 (12)	12 (4)	D1 (Neg)	D3 (D3)/ D1, D2 (D3)	02 (1)	–	–	
Santo Amaro	2 (1)	–	–	–	–	170 (8)	D3 (D3)	–	
Afogados	3 (1)	1 (1)	2 (2)	D3 (D3)	–	–	–	–	
Estância	1 (0)	2 (1)	–	–	–	290 (17)	D1, D3 (Neg)	–	
Jardim São Paulo	1 (0)	–	–	–	–	68 (3)	–	–	
Bongi	2 (0)	7 (1)	–	–	–	76 (3)	–	–	
San Martin	3 (0)	7 (2)	4 (1)	–	–	40 (2)	–	–	
Torrões	2 (0)	1 (1)	–	–	–	106 (5)	D3 (Neg)	D2 (Neg)	
Campo Grande	2 (0)	6 (2)	1 (1)	–	–	123 (4)	–	–	
Casa Forte	4 (0)	25 (3)	6 (3)	–	–	93 (5)	–	–	
Água Fria	2 (2)	1 (1)	–	–	D2 (D3)	58 (3)	–	D2 (D3)/D2 (D3)	
Derby	1 (0)	–	–	–	–	40 (2)	–	–	
Torre	1 (0)	–	–	–	–	135 (5)	–	–	
Novo Prado	2 (0)	18 (2)	24 (3)	–	–	184 (7)	–	–	
Total	70	213 (56)	88 (27)	3	6	2972 (139)	7	10	

<sup>a</sup>Districts of Recife PE, Brazil, where mosquitoes were collected based on patients with suspicion of dengue, as informed by LAVITE; <sup>b</sup>Number of patient's houses where mosquito collection was performed in the study and in parentheses the number of confirmed dengue positive patients, according to LAVITE; <sup>c</sup>Number of adult *Ae. aegypti* collected in the houses and in parentheses number of assayed pools for DENV detection; <sup>d</sup>Dengue virus (DENV) serotypes detected in mosquito pools from adults collected in the field and in parentheses DENV detected in patient's sample corresponding to the house where the mosquito pool was originated from (Neg= Patient's sample negative for DENV; D1= DENV-1; D2= DENV-2; D3=DENV-3); <sup>e</sup>Number of adult *Ae. aegypti* obtained from eggs collected in the houses and in parentheses number of assayed pools for DENV detection; <sup>f</sup>DENV serotypes detected in mosquito pools from eggs collected in the field and in parentheses DENV detected in patient's sample corresponding to the house where the mosquito pool was originated from. In d and f, samples separated by "/" were collected in different houses. M–Male; F–Female.

of eggs in houses where these samples were collected varied from 2 to 600.

*Dengue virus detection in mosquito samples:* From 83 pools of adults collected directly in nature, nine were positive for dengue virus and three serotypes were detected: DENV-1 was found in five of them, DENV-2 in two of them, and DENV-3 in two pools (Table 1). In the latter case, DENV serotype matched with that of the patient's sample. All positive pools were composed of adult females.

Regarding adults reared from eggs collected in ovitraps, the same DENV serotypes were detected, in a total of 17 positive pools (out of 139): three for DENV-1, 10 for DENV-2, and four for DENV-3 (Table 1). In this case, two DENV-3 positive pools matched with the patient's dengue serotype. In all the cases, mosquito and patient serotype matching did not occur with DENV-1 and DENV-2. Figure 1 shows the areas where positive mosquito samples were collected from.

*MIR:* DENV infection rate in wild *Ae. aegypti* was expressed as MIR. In the case of captured adults, MIR was 29.9 (Table 2), however, if we consider only pools composed of females (since DENV was detected in those, only), MIR rises to 42.2. MIR in mosquitoes reared from collected eggs was 6.0.

## Discussion

The co-circulation of three DENV serotypes has been recorded in the state of Pernambuco since the introduction of DENV-3 in 2002, when DENV-1 and DENV-2 were already present. DENV-3 became highly predominant in 2005 and 2006, and a low percentage of human samples were found infected with DENV-1 and DENV-2<sup>5,19</sup>. Results presented here on DENV detection in wild *Ae. aegypti* samples provide important information when considering the local dengue epidemiology. In adult mosquitoes collected in the field, as much as nine positive pools were found among a relatively low number of assayed mosquitoes (301 specimens). Moreover,

DENV-1, DENV-2 and DENV-3 were detected in these samples, i.e. besides the predominant serotype circulating in human population at the time (DENV-3), the two serotypes circulating in a lower frequency were also found. In the case of adults reared from eggs collected in the field, the same three serotypes were detected, showing that transovarial transmission is occurring in these populations with these serotypes, and indicating surveillance of immature forms can be as informative as monitoring adults in regard to detecting DENV serotypes circulating in mosquito populations.

When the data presented here are separated by year, only DENV-1 and DENV-3 were found in mosquitoes collected in 2005, corresponding to the same serotypes found in human samples in that year, where 95% of reported dengue cases were DENV-3 and 5% were DENV-1<sup>19</sup>. In 2006, the 3 serotypes were detected in mosquitoes, while in human samples, 94% of reported dengue cases were DENV-3 and 6% were DENV-2<sup>19</sup>. The results presented here show that although DENV-1 was not detected in human samples in 2006, it was still present in mosquito populations from Recife. Another observation was that the number of positive mosquito pools found in 2006 was twice of those found in 2005, even though the number of mosquito samples assayed in 2006 was much lower than those in 2005 and surveillance was performed in the first six months only. Interestingly, the number of dengue cases reported in 2006 (18,595) was higher than that of in 2005 (12,990), with a concentration of cases in the same period our study was conducted<sup>19</sup>.

Pinheiro *et al*<sup>11</sup>, while surveying DENV in *Ae. aegypti* from Manaus-Amazonas, Brazil, found a high infection rate, however, they only detected the local predominant serotype (DENV-3). It was suggested that DENV-3 had replaced the other previously circulating serotypes, since it had been recently introduced in the area and probably found in a non-immune population, facilitating its dispersion. Some studies mention that the prevalent serotype may persist for one to two years until it is replaced by a new one<sup>8,20</sup>. The study by

Table 2. Minimum infection rate (MIR) for dengue virus in *Aedes aegypti* collected in the field found in different studies

Stage of <i>Ae. aegypti</i> collected in the field	Stage of <i>Ae. aegypti</i> assayed for DENV	MIR	DENV	Country	Period	Includes dengue epidemic/outbreak period	Reference
Adult females	Adult females	56.2	1, 2, 3	Singapore	Apr 1995–Jul 1996	Yes	Chow <i>et al</i> 1998
		69	1, 2, 3, 4	Singapore	Apr 1997–Dec 2000	Yes	Chung and Pang 2002
		8.52	2	Brazil	Jul 2000–Jun 2001	Yes	Lourenco-de-Oliveira <i>et al</i> 2002
		15.9	1, 3, 4	Venezuela	Nov 2000–Dec 2001	Yes	Urdaneta <i>et al</i> 2005
		18	1, 2, 3	Mexico	Mar 2007–Feb 2008	Yes	Garcia-Rejon <i>et al</i> 2008
Adult males and females	Adult males and females <sup>a</sup>	20.7	3	Brazil	Feb–Jun 2003	Yes	Pinheiro <i>et al</i> 2005
		<b>29.9</b>	<b>1, 2, 3</b>	<b>Brazil</b>	<b>Jan 2005–Jun 2006</b>	<b>Yes</b>	<b>This study</b>
Adult males	Adult males	13.3	1, 2, 3, 4	Singapore	Sep 1997–Aug 1998	Yes	Chung <i>et al</i> 2001
		2.7	2, 3 <sup>b</sup>	India	Mar 2003–Dec 2004	NI	Arunachalam <i>et al</i> 2008
Larvae	Larvae	0.48	2	Burma	Sep 1978–Jul 1980	NI	Khin and Than 1983
		0	–	Singapore	Apr 1995–Jul 1996	Yes	Chow <i>et al</i> 1998
		0	–	Brazil	Feb–Jun 2003	Yes	Pinheiro <i>et al</i> 2005
		0	–	Mexico	Jan–Dec 2005	Yes	Gunther <i>et al</i> 2007
Eggs	Larvae	0	–	Brazil	Nov 2006–May 2007	Yes	Zeidler <i>et al</i> 2008
		18.3	2 <sup>c</sup>	Brazil	May 2003	Yes	Cecilio <i>et al</i> 2009
Larvae	Adult males and females	0.12	2	Burma	Sep 1978–Jul 1980	NI	Khin and Than 1983
Eggs, larvae, adults	Adult males and females	0.36	4	French Guiana	Oct 1993–Sep 1995	No	Fouque <i>et al</i> 2004
Larvae	Adult females	4.6	2, 3, 4	Mexico	Jan–Dec 2005	Yes	Gunther <i>et al</i> 2007

<sup>a</sup> Positive pools found only in females; <sup>b</sup> In this study, ELISA was the test to detect DENV, thus in many samples the serotype was not identified – serotypes 2 and 3 represent only a small fraction of samples; <sup>c</sup> The authors do not make clear if DENV-1 was found in *Ae. aegypti*, but mention it was detected in *Ae. albopictus*. NI= Not informed in the paper; MIR = Number of positive samples/total number of specimens assayed x 1000.

Urdaneta *et al*<sup>10</sup> in Venezuela serves as a good example of correlation on the serotypes circulating in the human population and the ones detected in mosquito samples. The authors were able to detect DENV-1 and DENV-4 in mosquitoes when four serotypes were simultaneously circulating in the human population, however, after the apparent displacement of the other serotypes by DENV-3, only the latter was detected in mosquitoes, with a relative high infection rate. Here, detection of DENV-1 and DENV-2 in mosquito samples may indicate that in Pernambuco these serotypes were starting to submerge in 2005 and 2006. In fact, in 2008 the predominant serotypes isolated from human samples were DENV-1 and DENV-2<sup>21</sup>.

It is noteworthy that some of the houses showed high infestation of *Ae. aegypti*, with over 50 adult females collected in a single house. This fact points out to the efficiency of indoor aspiration to collect mosquito specimens, as shown in other studies<sup>22</sup>. Because adult females are the transmitters of DENV, we believe indoor aspiration of adults could serve as an additional control activity<sup>23</sup>. Garcia-Rejon *et al*<sup>22</sup> performed mosquito collection in houses of people with suspicion of dengue in Mexico and showed that whenever there was concomitant DENV detection in human and mosquito samples, DENV serotype matched in all the cases. In this study, DENV serotype matching between mosquito and human samples occurred in a few cases and only with DENV-3. However, there were cases where DENV-1 and DENV-2 were found in mosquitoes and DENV-3 in patient samples, possibly reflecting the persistence of infected eggs in that environment for a long period or the active circulation of infected mosquitoes.

The lower minimum infection rate (MIR) observed in adults reared from eggs compared to adults collected straight from the field was expected, once transovarial transmission occurs in a much lower rate than horizontal transmission. A variety of studies have reported vertical transmission in *Aedes* spp collected in the field<sup>12,24–28</sup>. These data, combined with the results presented here, demonstrate the relevance of including immature forms in DENV detection sys-

tem in natural mosquito populations. Vertical transmission is one of the hypotheses on how the virus persists in nature in the absence of viremic vertebrate hosts<sup>9,29</sup>. Quiescent *Ae. aegypti* eggs can remain viable in the environment for many months and when hatched may be responsible for a burst of infections, especially if immunity to the serotype present in mosquitoes is low in the local human population. Moreover, passive transportation of eggs (e.g. transport of tyres containing eggs) is the main mode of dispersion for mosquitoes and infected eggs may introduce dengue in areas previously free of the virus. The fact that adult mosquitoes infected through transovarial transmission may not need to feed in a viremic vertebrate host to infect a naïve host, thus, eliminating the extrinsic incubation period, is also epidemiologically relevant.

In this study, MIR in collected adults was high. Interestingly, only pools composed of females were DENV-positive, and if MIR is calculated only for females, it increases by 1.5-fold. Infection rates in field-collected mosquitoes vary a lot among studies, going from half to higher values than the one obtained here (Table 2). In immature forms, MIR also varies among studies (Table 2). However, to compare infection rates among studies is extremely complex, since a variety of factors must be considered. For instance, the collection period (e.g. epidemic versus inter-epidemic), sample pool sizes, and number of processed samples have an influence on MIR<sup>30</sup>.

In case of immature forms, the stage processed for DENV detection assays (e.g. larvae *vs* adults reared from eggs) seem to influence the results, since a few studies show that when assays were performed with larvae DENV was not detected, while if adults reared from these larvae were assayed, DENV was detected<sup>9,26</sup>. Additionally, the type of assay (e.g. PCR *vs* ELISA) and PCR primers used to detect DENV may also affect results. Thus, all these factors combined with the local epidemiology, must be considered when analyzing MIR.

If DENV surveillance in mosquitoes is to be incorporated in control programs, and we believe it should,

it must follow some criteria such as the one utilized here (mosquito collection in houses related to potentially infected people) or others such as vector density data. Although we have not collected mosquitoes in all neighborhoods of Recife, sample collection was reasonably distributed throughout the city, as shown in Fig. 1. It is interesting to note that a few districts where mosquito samples were positive in 2005 were also positive in 2006. Regis *et al*<sup>31</sup> recently showed that *Ae. aegypti* in Recife is distributed throughout the city, however, some points, called hot spots, presented a higher density of mosquito populations. These areas remained as the most concentrated for *Ae. aegypti*, although in variable levels, through a period of at least one year, showing a certain stability of mosquito population distribution in a highly urbanized area. Such data could also be used for selecting areas for insect collection to perform DENV detection assays.

To conclude, the results presented here on DENV detection in mosquitoes corroborated with the local epidemiological data. First, the higher number of positive mosquito pools in 2006, in comparison to 2005, was also seen in human cases. Second, DENV-1 and DENV-2 were found in mosquito samples in 2005 and 2006, when these serotypes were found either in a very low frequency (5–6%) or not found at all in the human population, however, epidemiological data from 2008 show that these serotypes were seen in a higher frequency in human samples than DENV-3, which suggest that mosquitoes may serve as a maintenance mode for the virus in the environment and that when levels of population immunity to a certain serotype start to decrease, they will submerge. These results point out the informative power and high sensitivity of vector infection surveillance, with inclusion of immature forms.

### Acknowledgement

The authors are thankful to the insectary and field teams from the Department of Entomology at CPqAM/FIOCRUZ. This work received financial support from FIOCRUZ (grants Papes 0250.250. 110/2003 and PDTSP-Rede Dengue RDVE-03).

### References

- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 158–65.
- Strengthening the implementation of the global strategy for dengue fever/dengue hemorrhagic fever prevention and control*. Geneva: World Health Organization 2000.
- Barbosa da Silva J Jr, Siqueira JB Jr, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta FG Jr. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull* 2002; 23: 3–6.
- Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. [Accessed on 15 March 2007]. Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_010208.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf). 2007.
- Cordeiro MT, Schatzmayr HG, Nogueira RM, Oliveira VF, Melo WT, Carvalho EF. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the state of Pernambuco, 1995–2006. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 605–11.
- Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue, No. 1, 2008. [Accessed on 8 May 2008]. Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_mai0208.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_mai0208.pdf). 2008.
- Gubler DJ, Clark GG. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 50–60.
- Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, *et al*. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 578–86.
- Fouque F, Garinci R, Gaborit P. Epidemiological and entomological surveillance of the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-4 viruses in French Guiana. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 41–6.
- Urdaneta L, Herrera F, Pernaete M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R, *et al*. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 177–84.
- Pinheiro VC, Tadei WP, Barros PM, Vasconcelos PF, Cruz AC. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 833–9.
- Cecilio AB, Campanelli ES, Souza KP, Figueiredo LB,

- Resende MC. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Braz J Biol* 2009; 69: 123–7.
13. Lourenco-de-Oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 799–800.
  14. Zeidler JD, Acosta PO, Barreto PP, Cordeiro Jda S. Dengue virus in *Aedes aegypti* larvae and infestation dynamics in Roraima, Brazil. *Rev Saude Publica* 2008; 42: 986–91.
  15. Cordeiro MT, Silva AM, Brito CA, Nascimento EJ, Magalhaes MC, Guimaraes GF, et al. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 1128–34.
  16. Fay R, Perry S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosq News* 1965; 25: 276–81.
  17. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noorda J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495–503.
  18. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545–51.
  19. Cordeiro MT, Freese E, Schatzmayr H, Nogueira RM. In: *Vinte anos de evolução da dengue no Estado de Pernambuco*. Editora Universitária da UFPE 2008; p. 225.
  20. Lam SK. Rapid dengue diagnosis and interpretation. *Malays J Pathol* 1993; 15: 9–12.
  21. *Informe Epidemiológico Semanal sobre Dengue*. Recife: Prefeitura do Recife 2009.
  22. Garcia-Rejon J, Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Flores-Flores L, Del Pilar Rosado-Paredes E, Rivero-Cardenas N, et al. Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 940–50.
  23. Regis L, Souza WV, Furtado AF, Fonseca CD, Silveira Jr. JC, Ribeiro Jr. PJ, et al. An entomological surveillance system based on open spatial information for participative dengue control. *An Acad Bras Ciênc* 2009; 81: 1–8.
  24. Angel B, Joshi V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Vector Borne Dis* 2008; 45: 56–9.
  25. Arunachalam N, Tewari SC, Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res* 2008; 127: 395–7.
  26. Gunther J, Martinez-Munoz JP, Perez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. *Intervirology* 2007; 50: 347–52.
  27. Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 590–4.
  28. Kow CY, Koon LL, Yin PF. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. *J Med Entomol* 2001; 38: 475–9.
  29. Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 398–402.
  30. Gu W, Lampman R, Novak RJ. Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. *Med Vet Entomol* 2004; 18: 200–4.
  31. Regis L, Monteiro AM, Melo-Santos MA, Silveira Jr. JC, Furtado AF, Acioli RV et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 50–9.

*Corresponding author:* C.F.J. Ayres, Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife PE, Brazil.  
E-mail: tans@cpqam.fiocruz.br.

*Received:* 17 November 2009

*Accepted in revised form:* 19 March 2010