

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINE DALLA BONA

**APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E GENÉTICAS PARA
MONITORAMENTO DO VETOR E DO VÍRUS DENGUE**

CURITIBA

2012

ANA CAROLINE DALLA BONA

**APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E GENÉTICAS PARA
MONITORAMENTO DO VETOR E DO VÍRUS DENGUE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração Entomologia.

Orientador. Prof. Dr. Mário Antônio Navarro-Silva
Co-Orientadora. Prof.^a Dr.^a Adriana Lacerda Twerdochlib

CURITIBA

2012

ANA CAROLINE DALLA BONA

“APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E GENÉTICAS PARA
MONITORAMENTO DO VETOR E DO VÍRUS DENGUE”

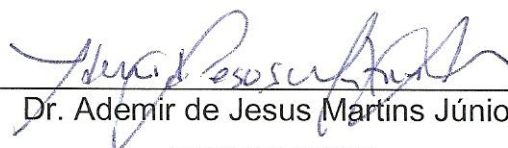
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Doutor em Ciências”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



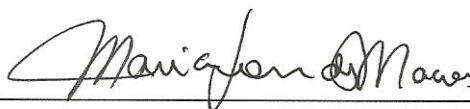
Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Dr. Rafael Maciel-de-Freitas
(FIOCRUZ/RJ)



Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior
(FIOCRUZ/RJ)



Dra. Maria de Lourdes da Graça Macoris
(SUCEN/SP)



Profa. Dra. Luciane Marinoni
(UFPR)

Curitiba, 16 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho ao meu esposo Cezar e aos meus pais Luiz Carlos e Sueli. Por todo amor, dedicação, por quem sou e por tudo que alcancei.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Mário A. Navarro-Silva que foi responsável pela minha formação acadêmica durante 10 anos. Agradeço por todas as oportunidades oferecidas que foram importantes para minha formação. Por toda confiança em mim depositada e dedicação que teve com a presente pesquisa. Obrigada por todos os conselhos, ensinamentos e amizade.

A minha co-orientadora Dra. Adriana L. Twerdochlib por todas as correções, dúvidas esclarecidas e amizade.

A todos os integrantes do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ) que foram responsáveis pela execução das coletas e fundamentais para este trabalho: André de Souza Leandro, Rosinei Kafka, Sebastião J de Oliveira, Sandro Roberto Galvão, Edson Espindola, Beatriz da Silva, Nivaldo de Oliveira Hotz Jr., José Batista, Pedrinho de Souza, Rosilene Santana de Jesus, Hector Gimenes, Liliana Barbosa, Vera Lúcia Santos, Eledir Terezinha de Carvalho, Jonas da Silva, Ileiny da Silva Santos, Iara Moreira, Gislaine da Silva, Angelita Alves da Silva, Clenice Borges de Almeida, Silvana Florêncio, Jose P. Pimentel, Roger Oliveira, Marcos Perciliano, Julio Cezar Silverio, Tatiane Bogenhagen, Marcia do Santos, Maria Aparecida Pinheiro, Adir dos Santos, Vera Lucia da Silva Conci, Claudécir Rocco, Marcos Paulo dos Santos, Felix Diba, Leonice M. Zenaro, Tavani Monteiro, Tatiane Oliveira, Cláucia V. Silva, Clarice Carvalho Soares, Jorge Alexandre de Melo, Maria do Carmo Ribeiro Cáceres, Eunice de Jesus, Patricia Franco Bezerra, Osandea Dalmazo de Almeida, Idalete Valensuelo, Miguel Denis, Alessandro José Fernandes, Anderson Rocha, Jorge Luiz Sanches, Gilmar Cardoso, Marilena de Oliveira, Adenil Lopes, Cezar Augusto Viomczak, Marlene Aparecida Cordeiro, Alene Simões de Oliveira, Eliane Souza, Rafael Jesus Neto, Isaac da Silva, Alcionir Lopes, Eva da Silva Gonçalves, Flávio Luiz Matinc, Jean Avenir Rios, Alessandra Ferreira, Rodinei Frederico, Ozilía Schmidt, Edilson R.de Souza, Jair Cristovão Varnie, James Barros, Jocemara da Silva, Anauzir Lorena, Roberto Pereira, Orestes Fecci Neto.

A Secretaria de Ciência e Tecnologia (SETI) pelos recursos fornecidos a pesquisa.

Ao CNPq processo número 140231/2008-0 pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós Graduação em Entomologia (Pgento) e a todos os professores que contribuíram para minha formação e me acolheram durante o mestrado e doutorado.

A toda equipe atual do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária: (LEMV) Mário Guedes, Gerson A. Muller, Josiane Prophiro, Isabel Assumpção, Vinícius Richardi, Débora Rebechi, Oscar A. A. Obando, Lígia Barizon, Betina Westhal, Gisele Moraes, Mayara, em especial ao Rodrigo Faitta Chitolina.

A Dra. Maria de Lourdes da Graça Macoris (SUCEN) por ceder os dados dos bioensaios de adultos com piretróides.

Ao Dr Rafael Maciel de Freitas (Fiocruz) por ceder as amostras de mosquitos infectados e os resultados com a detecção do antígeno viral NS1 em mosquitos.

A Anacleto Fellini (LACEN/PR) pelo fornecimento das amostras de cultura de células positivas para o vírus dengue.

A Msc. Carla Fernanda Piccoli por realizar a detecção da mutação do alelo Val1016Ile de 129 *Aedes aegypti* dos 234 analisados na presente pesquisa. Agradeço pelo fornecimento dos dados e amizade.

Ao Dr. Enéas Cordeiro (SESA), Dr. Allan Matins (LACEN/PR) e Luis Eduardo (SESA) que me ajudaram no transporte dos mosquitos com o botijão de nitrogênio líquido.

A Dra. Paula Borges do Laboratório de Biologia Molecular por toda ajuda.

A todos os meus familiares e amigos que fizeram parte desses quatro anos de minha vida e me ajudaram muito de maneira direta ou indireta.

E por último deixo algumas considerações especiais. Agradeço a Deus, por minha vida, minha família e saúde. Ao meu marido Cezar Capriglioni Carvalho Jr. por todo amor, amizade, companheirismo, ajuda, conselhos e compreensão nos momentos de ausência e dificuldade. E aos meus pais Sueli e Luiz Carlos Dalla Bona por toda a minha vida, por toda a minha jornada de estudante, por toda lealdade, dedicação, e pelo maior bem que me ensinaram a honestidade.

“Tenho-vos dito estas coisas, para que em mim tenhais paz. No mundo tereis tribulações; mas tende bom ânimo, eu venci o mundo.”

Bíblia, João capítulo 16, versículo 33

RESUMO

Com o propósito de avaliar a aplicação de ferramentas moleculares e genéticas para monitoramento do vetor e do vírus dengue, este trabalho foi dividido em três capítulos. No capítulo I foi abordada a diversidade genética dos vírus dengue sorotipos 1 e 2 no Estado do Paraná, baseada no fragmento da junção do gene capsídeo/pré-membrana. Os objetivos deste capítulo foram: 1) Analisar através do RT-PCR, isolados de cultura de células C6/36 positivos para o vírus dengue por imunofluorescência indireta de diferentes municípios do Paraná; 2) Realizar a análise filogenética das cepas isoladas no Paraná e outras cepas depositadas no GenBank. Co-infecção pelos sorotipos 1 e 2 foi observada em quatro pacientes de 11 analisados. Os produtos amplificados por RT-PCR foram sequenciados e agruparam-se no genótipo V para DENV-1 e no genótipo Asiático/Americano, para o DENV-2. Os dois genótipos encontrados formaram grupos monofiléticos. No capítulo II, foi avaliada a vigilância entomológica e a detecção do vírus dengue (*Flavivirus*, *Flaviviridae*) em vetores. Os objetivos deste capítulo foram: 1) Avaliar a infestação de fêmeas de *Aedes aegypti*, de ovos de *Aedes (Stegomyia)* sp. e a incidência de casos de dengue nos diferentes estratos do município de Foz do Iguaçu; 2) Detectar o vírus dengue em populações naturais de *A. aegypti* e *Aedes albopictus*; 3) Avaliar a armadilha Adultrap® como ferramenta para detecção do vírus dengue em vetores; 4) Investigar a transmissão transovariana em populações naturais de *A. aegypti*. Todos os estratos do município de Foz do Iguaçu estavam infestados pelo *A. aegypti*, e quando ocorreu epidemia de dengue em 2010 e 2011 todos os estratos apresentaram elevada incidência da doença. Com o auxílio da técnica de RT-PCR foram detectados cinco *pools* positivos para o vírus DENV-1 e/ou DENV-2 em fêmeas de *A. aegypti* congeladas vivas, provenientes das armadilhas de adultos em períodos de baixa transmissão de dengue em humanos. Utilizando a técnica para detecção do antígeno NS1 foram encontrados sete *pools* de mosquitos infectados com o vírus dengue, coletados com armadilha Adultrap® em residências de moradores com suspeita de dengue. Não foi detectado *A. albopictus* infectados com o vírus dengue e nem transmissão transovariana. A armadilha Adultrap® é uma ferramenta eficaz para detecção do vírus dengue em mosquitos. No capítulo III traçou-se o perfil genético e a resistência a inseticidas de *A. aegypti* em área de tríplice fronteira no Sul do Brasil. O objetivo do trabalho foi avaliar o *status* de suscetibilidade de larvas e adultos a inseticidas químicos, a frequência da mutação Val1016Ile relacionada com a resistência a piretróides e a variabilidade genética do fragmento do gene mitocondrial ND4 em populações de *A. aegypti* do município Foz do Iguaçu, Paraná. De acordo com os ensaios biológicos, as populações de *A. aegypti* da área de estudo não estão suscetíveis aos inseticidas temephos, cipermetrina e deltametrina. Em relação aos piretróides, a resistência foi corroborada com o encontro do alelo da mutação 1016Ile em todos os estratos. Dos 234 espécimes genotipadas para a mutação Val1016Ile, 15% eram homozigotos dominantes para o alelo selvagem (Val/Val); 62% foram heterozigotos (Va/Ile) e 23% foram homozigotos recessivos para a mutação (Ile/Ile). Em relação a variabilidade genética foi encontrada baixa diversidade genética e duas linhagens mitocondriais de *A. aegypti*.

Palavras-chave: RT-PCR. *Flavivirus*. DNA mitocondrial. Detecção viral. Resistência a inseticidas.

ABSTRACT

In order to evaluate the application of molecular and genetic tools to monitoring the vector and dengue virus, this study was divided into three chapters. In the chapter I addressed the Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, based on junction fragment of the capsid gene/pre-membrane. The objectives of this chapter were: 1) Analyze by RT-PCR, isolated from C6/36 cell culture positive for dengue viruses by immunofluorescence in different localities of the State, 2) Perform a phylogenetic analysis of isolated strains in Paraná and other strains deposited in GenBank. Co-infection by serotypes 1 and 2 was observed in four of 11 patients analyzed. All strains obtained in this study belonged to genotype V of DENV-1. The DENV-2 strains, by contrast, belonged to the American/Asian genotypes. The two genotypes found formed monophyletic groups. In Chapter II, we evaluated the entomological surveillance and detection of dengue virus (*Flavivirus*, *Flaviviridae*) into vectors. The objectives of this chapter were: 1) Evaluate the infestation of females of *Aedes aegypti*, eggs of *Aedes (Stegomyia)* sp. and the incidence of dengue cases in the different strata of the city of Foz do Iguacu, 2) Detect dengue virus in natural populations of *A. aegypti* and *Aedes albopictus*, 3) Evaluate the Adultrap® as a tool for detection of dengue virus in vectors; 4) investigate transovarial transmission in natural populations of *A. aegypti*. All strata of the city of Foz do Iguacu are infested by *A. aegypti*, and when dengue epidemic occurred in 2010 and 2011 all strata showed high incidence of the disease. With the aid of the technique of RT-PCR five positive pools for DENV-1 and/or DENV-2 were identified from frozen alive adults females of *A. aegypti* from the traps in periods of low transmission in humans. Using the technique for the detection of NS1 antigen we found seven pools of mosquitoes infected with dengue virus, collected with Adultrap® in homes of suspected dengue cases. There was no detectable *A. albopictus* infected with dengue virus and transovarian transmission. The Adultrap® was an effective tool for detection of dengue virus in mosquitoes. In Chapter III we traced the genetic profile and insecticide resistance of *A. aegypti* in the triple border area in southern Brazil. The objective of this study was to evaluate the susceptibility status of larvae and adults to chemical insecticides, the mutation frequency Val1016Ile associated with resistance to pyrethroids and genetic variability of the mitochondrial ND4 gene fragment in populations of *A. aegypti* in the city of Foz do Iguacu, Paraná. Populations of *A. aegypti* from the study area are not susceptible to insecticides temephos, cipermetina and deltrametrina according to the biological tests. Regarding pyrethroids, resistance was corroborated with the finding of allele mutation 1016Ile in all strata. Of the 234 samples genotyped for the mutation Val1016Ile, 15% were homozygous dominant for the wild allele (Val/Val), 62% were heterozygous (Val/Ile) and 23% were homozygous for the recessive mutation (Ile/Ile). Regarding the genetic variability, low genetic diversity and two mitochondrial lineages of *A. aegypti* were found.

Key words: RT-PCR. *Flavivirus*. Mitochondrial DNA. Viral detection. Insecticide resistance.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Municípios do Estado do Paraná (Brasil) onde foram coletadas amostras de sangue de pacientes positivos para o vírus dengue.....	34
Figura 2	Amplificados obtidos pela reação de RT-PCR para a detecção dos sorotipos virais 1 e 2 das amostras dos municípios do Paraná. M: 100-bp Marcador molecular (Amresco, Sólón,Ohio); 1 a 4 Amostras não amplificadas; 5: Amostra sem diluição de Pato Bragado, co-infecção por DENV-1 e DENV -2; 6: Amostra diluída de Pato Bragado, co-infecção por DENV-2 ; 7-8: Controle negativo; 9: Amostra sem diluição de Foz do Iguaçu infectada por DENV -1; 10: Amostra diluída de Foz do Iguaçu infectada por DENV -1; 11: Amostra sem diluição de Maringá infectada por DENV-2; 10: Amostra diluída de Maringá infectada por DENV-2.....	39
Figura 3	Análise filogenética com o método Neighbor-Joining do fragmento da região do gene CprM do DENV-1 e das sequências obtidas no GenBank. Os valores de <i>bootstrap</i> (calculado após 1000 réplicas) para o método de Kimura 2 parâmetros, encontram-se acima do nó de cada grupo principal.....	41
Figura 4	Análise filogenética com o método Neighbor-Joining do fragmento da região do gene CprM do DENV-2 e das sequências obtidas no GenBank. Os valores de <i>bootstrap</i> (calculado após 1000 réplicas) para o método de Kimura 2 parâmetros, encontram-se acima do nó de cada grupo principal.....	42

CAPÍTULO II

Figura 1	Divisão do município de Foz do Iguaçu localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, região Sul do Brasil, com indicações dos 11 estratos de acordo com LIRAA.....	66
Figura 2	Armadilha Adultrap® utilizada para captura de culicídeos no município de Foz do Iguaçu, Paraná. “A armadilha apresenta forma cilíndrica e na extremidade superior é côncava, contendo um espaço para passagem do mosquito. A inferior é convexa. Lateralmente, é revestida por uma tela fina, a qual está ligada a um recipiente para colocar água ou outra isca atrativa. Internamente, existem dois compartimentos separados por um material transparente em formato de cones contendo um orifício de tamanho suficiente para passagem do mosquito adulto. O recipiente para a isca é separado das partes internas da armadilha por uma tela, sem qualquer chance de contato direto do mosquito com a isca usada” (GOMES et al., 2007).....	68
Figura 3	Armadilha ovitampa composta por um vaso preto de 500 ml, uma paleta de eucatex presa com um clipe ao suporte de plástico preto. Foto cedida por Rosinei Kafka (CCZ-Foz do Iguaçu).....	70
Figura 4	Amplificados obtidos pela reação de RT-PCR. M: Marcador molecular de 100-bp (Amresco, Sólón, Ohio).; 1: controle negativo; 2: 1 mosquito com título viral 10^{10} infectado com DENV-2; 3: 1 mosquito com título viral 10^5 infectado com DENV-2; 4 e 5 produtos não amplificadas; 6: controle positivo de cultura de células C6/36 infectadas com DENV-2.....	73
Figura 5	Incidência de dengue por 100.000 habitantes durante as semanas epidemiológicas de 2008 e 2009 no município de Foz do Iguaçu, de acordo com dados do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu/SINAN.....	81
Figura 6	Incidência de dengue por 100.000 habitantes durante as semanas epidemiológicas de 2010 e 2011 no município de Foz do Iguaçu, de acordo com dados do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu/SINAN.....	81

Figura 7	Amplificados obtidos pela reação de RT-PCR. M1: Marcado molecular de 100-bp (Amresco, Sólón, Ohio); M2: Marcador molecular de 25-bp (Promega, Madison, WI); 3: Pool de dez fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectado com DENV-2 no estrato 2; 4: Pool de dez fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectado com DENV-2 no estrato 2; 5 e 6: Amostras não amplificadas; 7: Pool de dez fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectados com DENV-1 e DENV-2 no estrato 5.....	84
----------	--	----

CAPÍTULO III

Figura 1	Figura 1. Município de Foz do Iguaçu, apresentando a divisão em 11 estratos, localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, região Sul do Brasil.....	121
Figura 2	Município de Foz do Iguaçu, dividido em regiões Norte, Central e Sul, localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, Brasil.....	122
Figura 3	Esquema do procedimento do bioensaio de temephos com concentrações múltiplas (C1 a C9) e concentração diagnóstica (C6: 0.0162 ppm), totalizando quatro réplicas (R1 a R4), em quatro dias diferentes, mantido em câmara BOD a 26°C.....	124
Figura 4	Esquema do procedimento de controle de estabilidade do temephos com a população suscetível Rockefeller, com duas concentrações de temephos e um controle com etanol, mantido em câmara BOD a 26°C.....	125
Figura 5	Amplificados obtidos através da PCR alelo-específica. 1: Indivíduo homozigoto recessivo para o alelo mutante (Ile/Ile), 2: Indivíduo heretozigoto (Val/Ile), 3 e 4: Amostras não amplificadas, 5: Indivíduo homozigoto dominante para o alelo selvagem (Val/Val), 6: Amostras não amplificadas, M: Marcador molecular de 25 pb (Promega, Madison, WI).....	127
Figura 6	M: Marcador molecular de 100 pb (Amresco, Solon, Ohio). Produtos de amplificação do fragmento do gene ND4 de 13 indivíduos de <i>Aedes aegypti</i> (1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17) com tamanho aproximado de 336 pares de base (pb). 3, 5, 8, 16, 18 e 19: Amostras não amplificadas.....	129
Figura 7	Frequências dos alelos selvagem (1016Val) e mutante (1016Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i> nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.....	135
Figura 8	Porcentagem de genótipos homozigotos recessivos, dominantes e heterozigotos em relação aos haplótipos H1 (A); H2 (B) de <i>Aedes aegypti</i> . Porcentagem dos alelos recessivos e dominantes em relação aos haplótipos H1 (C); H2 (D) de <i>Aedes aegypti</i>	138

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela I	Distribuição geográfica dos genótipos pertencentes aos quatro sorotipos do vírus dengue.....	28
Tabela II	Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do vírus do dengue e dos seus respectivos sorotipos, de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (1992).)	35
Tabela III	Distribuição geográfica, código de acesso ao GenBank e ano de isolamento da cepas do vírus dengue encontradas no presente trabalho e das cepas selecionadas no GenBank para análise filogenética.....	37
Tabela IV	Amostras de pacientes de 11 municípios do Estado do Paraná (Brasil), infectadas com o vírus do dengue e detectadas por RT-PCR e imunofluorescência indireta (IFI).....	38
Tabela V	Mudanças nucleotídicas encontradas nas sequências do sorotipo 1 do vírus do dengue no Estado do Paraná.....	40

CAPÍTULO II

Tabela I	Número de quarteirões, imóveis, imóveis por armadilha e habitantes, nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	66
Tabela II	Coletas realizadas com a armadilha Adultrap® por data, estação do ano e semana epidemiológica, no município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	67
Tabela III	Coletas realizadas com a armadilha ovitrampa por data, estação do ano e semana epidemiológica, no município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	70
Tabela IV	Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do vírus do dengue e dos seus respectivos sorotipos, de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (1992).....	73
Tabela V	Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> a cada 1000 imóveis, coletadas de dezembro de 2008 a setembro de 2010 com Adultrap® nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.....	75
Tabela VI	Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> a cada 1000 habitantes, coletadas de dezembro de 2008 a setembro de 2010 com Adultrap® nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.....	76
Tabela VII	Porcentagem de emergência (%), média e desvio padrão dos ovos coletados com ovitrampas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, de dezembro de 2008 a outubro de 2010.....	77
Tabela VIII	Número de machos e fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> emergidos dos ovos provenientes das ovitrampas instaladas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu entre dezembro de 2008 a outubro de 2010.....	77
Tabela IX	Número de machos e fêmeas de <i>Aedes albopictus</i> emergidos dos ovos provenientes das ovitrampas instaladas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu entre dezembro de 2008 a outubro de 2010.....	78
Tabela X	Índice de positividade das ovitrampas (IPO) distribuídas por estrato e data de coleta (semana epidemiológica) no município de Foz do Iguaçu.....	78
Tabela XI	Índice de densidade de ovos (IDO) por estrato e data de coleta (semana epidemiológica) no município de Foz do Iguaçu.....	79
Tabela XII	Número de casos de dengue confirmados e incidência da doença por 100.000 habitantes nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná de 2008 a 2011.....	80
Tabela XIII	Incidência de dengue por 100.000 habitantes nas semanas epidemiológicas onde foram realizadas as coletas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná de 2008 a 2011.....	80
Tabela XIV	Sorotipos do vírus dengue isolados de casos humanos de 2008 a 2011, nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	82

Tabela XV	Número de fêmeas congeladas vivas e mortas, <i>pools</i> processados e <i>pools</i> positivos de <i>Aedes aegypti</i> , coletados com armadilha Adultrap® e avaliados pela técnica de RT-PCR, no município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	83
Tabela XVI	<i>Pools</i> positivos de <i>Aedes aegypti</i> coletados com a armadilha Adultrap® no município de Foz do Iguaçu e avaliados pela técnica RT-PCR, de acordo com o sorotipo, número de fêmeas, estrato, data e semana epidemiológica.....	83
Tabela XVII	<i>Pools</i> formados (PF) e <i>pools</i> positivos (PP) (%) para o vírus do dengue, de fêmeas congeladas vivas de <i>Aedes aegypti</i> , coletadas com armadilha Adultrap® nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu e avaliadas pela técnica RT-PCR.....	84
Tabela XVIII	Número de mosquitos machos congelados vivos ou mortos, <i>pools</i> processados e <i>pools</i> positivos de <i>Aedes aegypti</i> , coletados com armadilha Adultrap® no município de Foz do Iguaçu e avaliados pela técnica de RT-PCR.....	85
Tabela XIX	Número de fêmeas congeladas vivas e mortas, <i>pools</i> processados e <i>pools</i> positivos de <i>Aedes albopictus</i> , coletados com armadilha Adultrap® no município de Foz do Iguaçu e avaliados pela técnica de RT-PCR.....	85
Tabela XX	<i>Pools</i> processados, número de <i>Aedes aegypti</i> e <i>pools</i> positivos para técnica de RT-PCR e detecção do antígeno NS1, nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	86
Tabela XXI	Número de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> por <i>pool</i> positivo, data de coleta e semana epidemiológica dos mosquitos avaliados através do antígeno NS1, nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	86
Tabela XXII	<i>Pools</i> processados, <i>pools</i> positivos para o vírus do dengue e número de adultos de <i>Aedes aegypti</i> provenientes das armadilhas ovitrampas instaladas no município de Foz do Iguaçu e analisados pela técnica de RT-PCR.....	87

CAPÍTULO III

Tabela I	<i>Status</i> de suscetibilidade ao temephos de algumas populações brasileiras de <i>Aedes aegypti</i>	111
Tabela II	Bioensaios com a concentração diagnóstica 0,0162 ppm (calibrada com a cepa Rockefeller) em larvas de <i>Aedes aegypti</i> provenientes de três regiões do municípios de Foz do Iguaçu Paraná em 2008.....	131
Tabela III	Geração da população, qui-quadrado, <i>slope</i> , concentrações letais, razões de resistência das larvas de <i>Aedes aegypti</i> para temephos em três regiões no município de Foz do Iguaçu, utilizando como controle a cepa Rockefeller.....	132
Tabela IV	Bioensaios com a concentração diagnóstica de cipermetrina (146 mg i.a./m ²) e deltametrina (18 mg i.a./m ²) para adultos de <i>Aedes aegypti</i> provenientes do municípios de Foz do Iguaçu Paraná em 2008.....	133
Tabela V	Número de indivíduos analisados e frequências genotípicas para mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i> , coletados em 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, durante quatro períodos diferentes.....	134
Tabela VI	Número de indivíduos de cada haplótipo de <i>Aedes aegypti</i> , coletados em 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, durante quatro períodos diferentes.....	136
Tabela VII	Posição das heteroplasmias encontradas nas sequências de <i>Aedes aegypti</i>	136
Tabela VIII	Análise de variância molecular (AMOVA) de <i>Aedes aegypti</i> considerando como grupos os 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.....	137
Tabela IX	Fluxo gênico (distância geográfica em km) (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) entre amostras de <i>Aedes aegypti</i> de 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
aa	Aminoácido
AChE	Acetilcolinesterase
ADE	Antibody dependent enhancement
A.	<i>Aedes</i>
Ala	Alanina
AMOVA	Análise de variância molecular
AMV	Avian myeloblastosis virus
ANOVA	Análise de variância
bp	Pares de base
bti	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>
C	Citosina
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CD	Concentração diagnóstica
cDNA	DNA complementar
CL	Concentração letal
cm	Centímetro
°C	Grau Celsius
DENV	Vírus dengue
DEPC	Dietil pirocarbonato de sódio
dez	Dezembro
dNTP	Desorribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
fev	Fevereiro
Fiocruz	Fundação do Instituto Oswaldo Cruz
Fst	Índice de fixação
G	Guanina
g	gramas
Gly	Glicina
H	Haplótipo
h	Horas
Hd	Diversidade haplotípica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IDO	Índice de densidade de ovos
IDT	Integrated DNA Technologies
IFI	Imunofluorescência indireta
Ile	Isoleucina
IPO	Índice de positividade de ovitrampas
K	Número médio de diferenças nucleotídicas
kdr	<i>Knockdown resistance</i>
km	Quilômetros
Km ²	Quilômetros quadrados
LACEN	Laboratório Central do Paraná
LEMV	Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária
M	Molar
mai	Maio
mar	Março
Met	Metionina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MoReNAa	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>Aedes aegypti</i>
ND4	Gene que codifica a nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4
ng	Nanograma
Nm	Fluxo médio
O	Oeste
OMS	Organização Mundial da Saúde
out	Outubro
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
pmoles	Picomoles
ppm	Partes por milhão
PR	Paraná
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotações por minuto
RR	Razão de resistência
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
RT-PCR em tempo real	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SE	Sergipe
SESA	Secretaria de Estado da Saúde
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
sp	Espécie
T	Timina
Taq	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão formado por Tris hidrocloreto/borato/EDTA
TE	Tampão formado por Tris hidrocloreto/EDTA
TMI	Taxa mínima de infecção
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades
UTR	Região não codificante
V	Volt
Val	Valina
X ²	Chi quadrado
μM	Micromolar
μL	Microlitros
π	Diversidade nucleotídica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
REFERÊNCIAS.....	22

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE GENÉTICA DOS VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2 NO ESTADO DO PARANÁ, BASEADA NO FRAGMENTO DA JUNÇÃO DO GENE CAPSÍDEO/PRÉ-MEMBRANA

RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 <i>Flavivirus</i> e diversidade genética.....	27
1.2 Vírus no hospedeiro humano.....	28
1.3 Dengue no Brasil e no Estado do Paraná.....	30
1.4 Justificativa.....	31
2 OBJETIVO GERAL.....	32
2.1 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Área de estudo.....	33
3.2 Extração do RNA viral e transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	34
3.3 Purificação e sequenciamento.....	36
3.4 Análises das sequências.....	36
4 RESULTADOS.....	38
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS.....	47

CAPÍTULO II

VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA E DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE (*FLAVIVIRUS*, *FLAVIVIRIDAE*) EM VETORES

RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
1.1 Vírus e vetor.....	56
1.2 Detecção do vírus dengue em mosquitos.....	57
1.2.1 Isolamento viral.....	58
1.2.2 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	59
1.2.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR em tempo real).....	60
1.2.4 Ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno.....	61
1.3 Vigilância entomológica e vigilância virológica.....	61
1.4 Justificativa.....	62
2 OBJETIVO GERAL.....	64

2.1	Objetivos específicos.....	64
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.1	Área de estudo.....	65
3.1.1	Divisão geográfica do município de Foz do Iguaçu.....	65
3.2	Procedimentos de coleta e laboratório.....	67
3.2.1	Armadilha Adultrap®.....	67
3.2.1.1	Captura de mosquitos em períodos interepidêmicos e de transmissão.....	67
3.2.1.2	Captura de mosquitos em residências de moradores com suspeita de dengue.....	69
3.2.2	Captura de mosquitos para detecção da transmissão transovariana.....	69
3.2.2.1	Criação dos mosquitos coletados com as armadilhas ovitrampas para detecção da transmissão transovariana...	71
3.2.3	Extração do RNA viral.....	71
3.2.4	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	72
3.2.5	Confirmação da técnica de extração e RT-PCR em mosquitos experimentalmente infectados.....	73
3.2.6	Detecção do vírus dengue através da técnica de captura do antígeno NS1.....	74
3.3.	Levantamento dos dados epidemiológicos.....	74
3.4	Análises dos dados.....	74
4	RESULTADOS.....	75
4.1	Dados bioecológicos.....	75
4.1.1	Adultrap®.....	75
4.1.2	Ovitampa.....	76
4.2	Dados epidemiológicos.....	79
4.3	Detecção do vírus dengue.....	83
4.3.1	Adultrap®.....	83
4.3.1.1	Captura de mosquitos em períodos interepidêmicos e de transmissão.....	83
4.3.1.2	Captura de mosquitos direcionada para residências de moradores com suspeita de dengue.....	85
4.3.2	Ovitampa.....	86
5	DISCUSSÃO.....	88
5.1	Dados bioecológicos.....	88
5.2	Detecção viral.....	90
6	CONCLUSÕES.....	97
7	REFERÊNCIAS.....	98

CAPÍTULO III

Aedes (Stegomyia) aegypti (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE): PERFIL GENÉTICO E RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM ÁREA DE TRÍPLICE FRONTEIRA NO SUL DO BRASIL

	RESUMO.....	108
	ABSTRACT.....	109
1	INTRODUÇÃO.....	110

1.1	Resistência ao organofosforado temephos.....	110
1.2	Resistência a piretróides – Alteração do sítio alvo.....	112
1.3	Diversidade genética.....	114
1.4	Justificativa.....	116
2	OBJETIVO GERAL.....	118
2.1	Objetivos específicos.....	118
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	119
3.1	Área de estudo.....	119
3.2	Procedimentos de coleta.....	119
3.3	Procedimentos em laboratório.....	120
3.3.1	Bioensaios da suscetibilidade de <i>Aedes aegypti</i> ao temephos.....	122
3.3.1.1	Bioensaio com temephos: Concentração diagnóstica.....	123
3.3.1.2	Bioensaio com temephos: Concentrações múltiplas.....	123
3.3.2	Bioensaios da suscetibilidade de <i>Aedes aegypti</i> aos piretróides: Concentração diagnóstica.....	125
3.3.3	Extração de DNA para análise dos fragmentos dos genes canal de sódio voltagem-dependente e ND4.....	125
3.3.4	Amplificação gênica alelo específica do fragmento do gene canal de sódio voltagem-dependente (códon 1016).....	126
3.3.4.1	Cálculos das frequências alélicas e genotípicas.....	127
3.3.5	Amplificação do fragmento do gene ND4.....	128
3.3.5.1	Purificação e sequenciamento do fragmento do gene ND4.....	129
3.3.5.2	Análises das sequências do fragmento do gene ND4.....	129
4.	RESULTADOS.....	131
4.1	Bioensaios da suscetibilidade de <i>Aedes aegypti</i> ao temephos.....	131
4.1.1	Bioensaio com temephos: Concentração diagnóstica.....	131
4.1.2	Bioensaio com temephos: Concentrações múltiplas.....	131
4.2	Bioensaios da suscetibilidade de <i>Aedes aegypti</i> aos piretróides: Concentração diagnóstica.....	133
4.3	Genotipagem do códon 1016 do fragmento do gene canal de sódio voltagem-dependente.....	133
4.4	Fragmento do gene mitocondrial ND4.....	135
4.5	Correlação entre diversidade genética e o alelo da mutação 1016lle.....	138
5	DISCUSSÃO.....	139
6	CONCLUSÕES.....	144
7	REFERÊNCIAS.....	145
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153
	ANEXO.....	155

INTRODUÇÃO GERAL

A família Culicidae pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, infraordem Culicomorpha, esta dividida em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae. Possui 3490 espécies descritas, distribuídas em 44 gêneros e 145 subgêneros. (HARBACH, 2007). Muitas espécies de Culicidae apresentam relevância em saúde pública devido ao hábito hematofágico das fêmeas, podendo transmitir inúmeros agentes etiológicos que causam agravo à saúde humana e animal. Dentre elas podemos destacar: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), principal vetor do vírus dengue e do vírus febre amarela no ciclo urbano da doença (VASCONCELOS, 2003).

Aedes aegypti desenvolveu em sua trajetória evolutiva um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico. A capacidade de dispersão e colonização desta espécie é facilitada por três atributos: estreita associação com o homem, utilização de recipientes artificiais para seu desenvolvimento e a resistência de seus ovos à dessecação por meses (NATAL, 2002; BEEBE *et al.*, 2005).

Em média uma fêmea de *Aedes aegypti* produz cerca de 120 ovos, para isso ela precisa ingerir cerca de 3,0 a 3,5 mg de sangue, podendo entrar em contato com mais de um hospedeiro, no mesmo ciclo gonotrófico, para realizar o repasto sanguíneo. O ritmo de atividade de oviposição das fêmeas obedece ao ciclo diurno, sendo considerado bimodal, com um pico matutino (6h às 8h) e outro vespertino (16h às 18h) (BARATA *et al.*, 2001; FORATTINI, 2002).

O sucesso reprodutivo destes mosquitos está intimamente relacionado à seleção do local de oviposição, fator crítico para a sobrevivência e dinâmica das populações. As fêmeas de *Aedes aegypti* distribuem seus ovos em múltiplos criadouros, comportamento chamado de “oviposição aos saltos”. Uma fêmea pode colocar de 11 a 30 ovos por criadouro. O sítio escolhido para oviposição é resultante da interação de uma complexa rede de fatores químicos e físicos, envolvendo respostas visuais, táteis e olfativas (BENTLEY & DAY 1989; CORBET & CHADEE 1993; APOSTAL *et al.*, 1994).

Tanto os ambientes urbanos quanto os rurais, sofrem modificações profundas devido à atividade humana, a qual influencia formas imaturas de culicídeos ditos sinantrópicos que tendem a ocupar determinados tipos de criadouros, na sua maioria, artificiais (SILVA, 2002). Os criadouros preferenciais para *Aedes aegypti* são os recipientes artificiais como vasos de plantas, vasilhames de plástico e vidro, pneus, pequenos e grandes reservatórios de água e criadouros provenientes do lixo doméstico (SOUZA-SANTOS, 1999). O vetor também já foi encontrado em bromélias (FORATTINI & MARQUES, 2000) e bebedouros domésticos (SILVA, 2004).

De acordo com Varejão *et al.* (2005), este vetor prefere reproduzir-se em reservatórios de águas limpas. No entanto, novos hábitos estão sendo detectados para *Aedes aegypti* podendo levar a ocupação de reservatórios ricos em matéria orgânica. Beserra *et al.* (2009), comentam que apesar da baixa viabilidade larval, foi possível o desenvolvimento de larvas em diferentes amostras de água, inclusive naquelas com elevada concentração de matéria orgânica.

Beserra *et al.* (2006), estudando a biologia de *Aedes aegypti*, concluíram que a temperatura favorável ao desenvolvimento do vetor encontra-se entre 21°C e 29°C, e para a longevidade e fecundidade dos adultos a temperatura ideal é entre 22°C e 30°C. Em 26°C, o tempo médio de desenvolvimento para as fases de ovo, larva e pupa varia de 4,34 dias, 8,24 dias e de 2,36 dias, respectivamente.

Os ovos de *Aedes aegypti* podem resistir às adversidades climáticas (SILVA, 1998) podendo suportar o dessecação e permanecendo viáveis por longos períodos. Os ovos são altamente permeáveis, porém, essa permeabilidade dura poucas horas (12 a 13 horas), até a formação da cutícula serosa, a qual torna o ovo impermeável ao meio externo, resistindo a períodos de dessecação (REZENDE *et al.*, 2008).

A significativa incidência sazonal da dengue nos meses quentes está associada ao ciclo reprodutivo do *Aedes aegypti*, a variações de temperaturas e precipitações elevadas (STEIN *et al.*, 2005). A dengue e a febre hemorrágica da dengue são importantes problemas de saúde pública nos trópicos e subtropicais. A dengue tem afetado mais de 100 países e 2,5 bilhões de pessoas em áreas endêmicas, tais quais as Américas, Sudeste Asiático, oeste do Pacífico, África e leste do Mediterrâneo (GUSMÁN & KOURÍ, 2002).

No Brasil, desde 1846 há relatos de epidemias de dengue (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Entre 1923 a 1981 os casos da doença foram interrompidos no território (CATÃO & GUIMARÃES, 2008). Atualmente a doença é considerada reemergente no Brasil, entre 2000 e 2009 foram notificados cerca de 4 milhões de casos de dengue, com destaque para os anos de 2002 e 2008, quando ocorreram as maiores epidemias registradas durante esse período (PENA *et al.* 2011).

Como ainda não existe uma vacina eficaz para imunização da população de humanos suscetíveis, a alternativa é o controle do vetor associado a medidas de saneamento ambiental, direcionado à redução de locais potenciais que acumulem água.

Como medidas do controle de vetores, são realizadas ações direcionadas à eliminação dos criadouros. Como por exemplo, a ação social que seria a participação da população com medidas educacionais para evitar a proliferação do vetor. O controle químico em situações de emergência e o controle biológico como, por exemplo, a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (SUCEN, 2011). Recentemente tem-se estudado controle do vetor utilizando mosquitos geneticamente modificados que são estéreis (WILKE *et al.*, 2009).

Para efetuar ações de controle devemos conhecer a população de vetores em todos os seus aspectos: genéticos, moleculares, bioquímicos, ecológicos, biológicos, fisiológicos, parâmetros de resistência a inseticidas, bem como suas interações com os outros organismos, os quais fazem parte do ciclo da doença. Tais fatores contribuem na obtenção de conhecimentos específicos, uma vez que melhoram ou complementam as medidas adotadas pelos órgãos oficiais responsáveis pelas execuções do controle dos vetores.

REFERÊNCIAS

APOSTAL, B. L.; BLACK, W. C.; REITER, P.; MILLER, B. R. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 89-97, 1994.

BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; CHIARAVALLI, N.; GLASSER, C. M.; BARATA, J. M. S.; NATAL, D. *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in Southeast Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 237-242, 2001.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Cadernos de Estudos Avançados**, v. 22, p. 53-72, 2008.

BEEBE, N. W.; WHELAN, P. I.; HURK, A.; RITCHIE, S. A.; COOPER, R. D. Genetic diversity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Australia and implications for future surveillance and mainland incursion monitoring. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 29, p. 299-303, 2005.

BENTLEY, M. D.; DAY, J. F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 401-21, 1989.

BESERRA, E. B.; CASTRO-JUNIOR, F. P.; SANTOS, J. W.; SANTOS, T. S.; FERNANDES, C. R. M. Biologia e exigências térmicas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 853-860, 2006.

BESERRA, E. B.; FREITAS, E. M. de; SOUZA, J. T. DE; FERNANDEZ, C. R. M.; SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia**, v. 99, p. 281-285, 2009.

CATÃO, R. C.; GUIMARÃES, R. B. Mapeamento da reemergência do dengue no Brasil – 1981/82-2008. **HYGEIA, Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v.7, p. 173-185, 2011.

CORBET, P. S.; CHADEE, D. D. An improved method for detecting substrate preferences shown by mosquitoes that exhibit 'skip oviposition'. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 114–118, 1993.

FORATTINI, O. P.; MARQUES, G. R. A. M. Nota sobre o encontro de *Aedes aegypti* em bromélias. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 543-544, 2000.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**, vol.2. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 864 p., 2002.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 33-42, 2002

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591-638, 2007.

NATAL, D. Bioecologia *Aedes aegypti*. **Biológico**, v.64, p. 205-207, 2002.

PENNA, G. O.; DOMINGUES, C. M. A. S.; SIQUEIRA JR, J. B.; ELKHOURY, A. N. S. M.; CECHINEL, M. P.; GROSSI, M. A. F.; GOMES, M. L. S.; SENA, J. M.; PEREIRA, G. F. M.; LIMA JÚNIOR, D. E. F.; SEGATTO, T. C. S.; MELO, F. C.; ROSA, F. M.; SILVA, M. M.; NICOLAU, R. A. Doenças dermatológicas de notificação compulsória no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 865-877, 2011 .

REZENDE, G. L.; MARTINS, A. J.; GENTILE, C. ; FARNESI, L. C.; PELAJO-MACHADO, M.; PEIXOTO, A. A., VALLE, D.. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. **BMC Developmental Biology**, v. 8, p. 1-12, 2008.

SILVA, H. H. G. Período de quiescência dos ovos e ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 113-114, 1998.

SILVA, A. M. Imaturos de mosquito (Diptera, Culicidae) de áreas urbana e rural no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Iheringia**, v. 92, p. 31-36, 2002.

_____. Bebedouro doméstico como criadouro de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 139-140, 2004.

SOUZA-SANTOS, R. Fatores associados à ocorrência de formas imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p. 373-382, 1999.

STEIN, M.; G. I. ORIA; W. R. ALMIRÓN; WILLENER J. A. Fluctuación estacional de *Aedes aegypti* em Chaco, Argentina. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 559-564, 2005.

SUCEN, 2011. **Controle integrado dos vetores de dengue**. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/down/vetores_geral/den_contri.pdf SUCEN 2011>. Acesso em: 20/12/2011.

VAREJÃO, J. B. M.; SANTOS, C. B. DOS; REZENDE, H. R.; BEVILACQUA, L. C.; FALQUETO, A. Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 238-240, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 275-293, 2003.

WILKE, A. B. B.; GOMES, A. C.; NATAL, D.; MARRELLI, M. T.. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. **Revista de Saúde Pública**, v.43, p. 869-874, 2009.

CAPÍTULO I

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2 NO
ESTADO DO PARANÁ, BASEADA NO FRAGMENTO DA JUNÇÃO DO GENE
CAPSÍDEO/PRÉ-MEMBRANA**

RESUMO

A identificação da variante genética do vírus dengue é importante para compreender a dispersão, virulência e identificação das cepas responsáveis pelas epidemias. Os objetivos da pesquisa foram: investigar a variação genética do fragmento da junção do gene capsídeo/pré-membrana dos sorotipos 1 e 2 e realizar a análise filogenética das cepas isoladas no Paraná e de outras sequências depositadas no GenBank. Amostras de 11 municípios do Estado do Paraná foram cedidas pelo Laboratório Central do Paraná e consistiam em isolados de cultura de células da linhagem C6/36 (*Aedes albopictus*), positivos para o vírus dengue pela técnica de imunofluorescência indireta. O RNA dessas amostras foi extraído, seguido da transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase (PCR), *nested* PCR e sequenciamento. Co-infecção por DENV-1 e DENV-2 foi observada em quatro pacientes, através da técnica RT-PCR. Em relação às cepas do DENV-1 a similaridade variou de 95% a 100% comparado às cepas do Genbank. Já na cepa do DENV-2, a similaridade variou de 98% a 100%. De acordo com o cladograma gerado, todas as cepas deste estudo se agruparam no genótipo V para DENV-1. Para o DENV-2 foi encontrada a cepa referente ao genótipo Asiático/Americano. O genótipo V (DENV-1) e o genótipo Asiático/Americano (DENV-2) formaram grupos monofiléticos. O monitoramento de novas cepas circulantes pode ser considerado como ferramenta estratégica na implementação de medidas adequadas para reduzir o impacto das epidemias.

Palavras-chaves: Co-infecção. RT-PCR. *Flavivirus*. Variação genética.

ABSTRACT

The identification of the genetic variants of the dengue virus is important to understand dispersion and virulence patterns, and to identify the strains responsible for epidemic outbreaks. This study aims to investigate the genetic variants of the capsid-premembrane junction region fragment in the 1 and 2 serotypes, and perform a phylogenetic analysis of strains isolated in Paraná and other sequences deposited in GenBank. Samples from eleven municipalities of Paraná State, were provided by the Central Laboratory of Paraná and consisted of isolated culture cell line C6/36 (*Aedes albopictus*), positive for dengue virus by indirect immunofluorescence. RNA extracted from these samples, was submitted to reverse transcription polymerase chain reaction (PCR), *nested* PCR and sequencing. RT-PCR revealed that four of our patients' samples were co-infection with both serotypes, DENV 1 and 2. The DENV-1 sequences obtained by us were 95 to 100% similar to sequences of other strains of the serotype 1 deposited on Genbank. Similarly, our DENV-2 sequences were 98 to 100% similar to other serotype 2 sequences on that database. According to our neighbor-joining tree, all strains obtained in this study belong in the genotype V of the DENV-1. The DENV-2 strain, by contrast, belongs to the American/Asian genotype. The genotype V (DENV-1) and genotype Asian/American (DENV-2) are monophyletic groups. Monitoring of new circulating strains can be considered as a strategic tool in the implementation of appropriate measures to reduce the impact of epidemics.

Key words: Coinfection. RT-PCR. *Flavivirus*. Genetic Variation

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Flavivirus* e diversidade genética

Os arbovírus (arthropod-borne-viruses) são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos). No gênero *Flavivirus* família *Flaviviridae* estão inseridos: o vírus da febre amarela, o complexo do vírus da encefalite japonesa, a encefalite de São Luís, o vírus do oeste do Nilo e o vírus dengue (DENV) (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

O genoma do vírus dengue é composto por uma fita única de ácido ribonucléico (RNA), com polaridade positiva contendo aproximadamente 11kb. O genoma possui uma única sequência de leitura aberta que codifica a formação das inúmeras proteínas virais, sendo flanqueada por duas regiões não codificantes 3'UTR e 5'UTR, que são importantes para a regulação e expressão do vírus. O genoma viral codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. As proteínas estruturais são: proteína do capsídeo (C), proteínas do envelope (E) e proteínas de membrana (M). Os vírus imaturos contém uma proteína precursora M conhecida como prM. As proteínas não estruturais são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade (ACOSTA-BAS & GÓMEZ-CORDERO, 2005; ROMANOS, 2008).

Através do sequenciamento de determinadas regiões do genoma tem-se procurado identificar as variantes genéticas dos sorotipos do vírus dengue. O gene E tem sido comumente utilizado, sendo este o principal alvo de seleção do vírus na natureza (PANDEY *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2009; ITO *et al.*, 2010). Singh e Seth (2001) sugerem a análise do fragmento da junção do gene capsídeo/pré-membrana (CprM) para estudos de epidemiologia molecular do vírus dengue. A região CprM tem sido utilizada por vários autores: WANG *et al.*, (2003); KUKRETI *et al.*, (2008); ARNOP *et al.*, (2010). Genes que codificam proteínas não-estruturais também têm sido utilizados nos estudos de filogenia (ZHANG *et al.*, 2004).

O vírus dengue apresenta elevada diversidade genética, cada sorotipo apresenta vários genótipos diferentes difundidos em diversas partes do mundo (Tabela I). Estudos moleculares e antigênicos têm procurado identificar cada sorotipo segundo suas variantes geográficas. Estes estudos mostram as variações decorrentes de mutações ao longo do tempo e distribuição geográfica do vírus (PONTES & RUFFINO-NETTO, 1994).

Tabela I. Distribuição geográfica dos genótipos pertencentes aos quatros sorotipos do vírus dengue.

Sorotipo	Genótipo	Distribuição geográfica	Referências
DENV-1	I	Havaí, China, sudeste da Ásia e Leste da África	GONÇALVES <i>et al.</i> (2002)
	II	Tailândia	
	III	Malásia	
	IV	Oeste do Pacífico e Austrália	
	V	Américas, Oeste da África e Ásia.	
DENV-2	Ásia	Malásia, Tailândia, Vietnã China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas	LEWIS <i>et al.</i> (1993); WEAVER & VASILAKIS (2009); CRUZ <i>et al.</i> (2010)
	Cosmopolita	Austrália, África Oriental e Ocidental, no Pacífico e ilhas do Oceano Índico, no subcontinente Indiano e no Oriente	
	Americano	América Latina e cepas mais antigas do Caribe, no subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico em 1950 e 1960	
	Asiático/ Americano Silvestre	Tailândia e Vietnã e cepas coletadas nas Américas ao longo dos últimos 20 anos. Amostras de seres humanos, mosquitos silvestres e macacos sentinelas no Oeste da África e Sudeste Asiático	
DENV-3	I	Porção marítima do Sudeste Asiático e ao Sul do Pacífico	ARAÚJO <i>et al.</i> (2009)
	II	Áreas continentais no Sudeste Asiático	
	III	Ásia, África Oriental e nas Américas	
DENV-4	I	Filipinas, Tailândia, Sri Lanka, América do Sul	LANCIOTTI <i>et al.</i> (1997); FIGUEIREDO <i>et al.</i> (2011)
	II	Indonésia, Taiti, Ilhas do Caribe e América Central e do Sul	

1.2 Vírus no hospedeiro humano

Humanos e alguns primatas representam hospedeiros naturais que podem ser infectados pelo vírus dengue, sendo que primatas não humanos podendo estar envolvidos em ciclos silvestres da doença (HENCHAL & PUTNAKO, 1990; GUBLER, 2004; MARCONDES & TAUIL, 2011). Outros mamíferos também já foram relatados como portadores de anticorpos contra o vírus dengue: tatu (*Dasypus spp*); ouriço

(*Coendou* spp); cuíca-cauda-de-rato (*Metachirus nudicaudatus*); cutia (*Dasyprocta leporina*); cervídeo (*Mazama* spp). O papel exato destas espécies acidentais não é conhecido, mas podem agir como reservatórios (THOISY *et al.*, 2004).

Nos humanos a infecção pelo vírus dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde formas clinicamente inaparentes até quadros graves de hemorragia e choque que podem evoluir para o óbito. A identificação precoce do aparecimento de casos é fundamental para o controle do vetor. Os casos assintomáticos são disseminadores do vírus, não fornecendo pistas para bloqueio do vetor.

A transmissão do vírus dengue do humano para o mosquito ocorre enquanto existir a presença do vírus no sangue humano (período de viremia). Este período começa um dia antes do aparecimento da febre e vai em média até o 6º dia da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Segundo Gibbons e Vaughn (2002) o período de incubação intrínseco no homem pode variar de 3 a 14 dias (tipicamente entre 5 a 7 dias).

O homem suscetível pode ser infectado pelo vírus dengue presente na saliva anticoagulante do vetor durante o repasto sanguíneo. Os vírus infectam as células dendríticas, replicam e migram para os linfonodos, após circulam na corrente sanguínea (período de viremia). A replicação dos vírus ocorre principalmente nos macrófagos. A infecção viral faz com que os linfócitos T sejam ativados e liberem interferon, proteína responsável pela redução da atividade da medula óssea e conseqüentemente a diminuição da produção de células sanguíneas (ROMANOS, 2008).

Após a infecção por um determinado sorotipo do dengue ocorre estímulo da imunidade celular e humoral. A produção de anticorpos neutralizantes contra um sorotipo é homóloga e duradoura, entretanto, a taxa de proteção cruzada contra outros sorotipos é ausente ou de curta duração. Vírus ligados a anticorpos neutralizantes são fagocitados com maior facilidade e perdem a capacidade de replicar no interior dos macrófagos (HASTEAD, 1988; BRICKS, 2004).

É comum ocorrer infecção com mais de um sorotipo do dengue e isto é esperado quando múltiplos sorotipos circulam na mesma região. De acordo com Loroño-Pino *et al.* (1999), a co-circulação de múltiplos sorotipos em áreas endêmicas é um dos fatores associados às manifestações clínicas e severas da doença. Estes autores após o diagnóstico de 292 amostras de soro humano detectaram 5,5% das amostras com mais de um sorotipo.

Algumas teorias têm sido desenvolvidas para explicar a ocorrência das formas hemorrágicas da dengue. Na ocorrência de duas infecções sequenciais por diferentes sorotipos a resposta imunológica do indivíduo sensibilizado seria amplificada pela segunda infecção, em função da existência prévia de anticorpo heterólogo (*Antibody dependent enhancement-ADE*), o que facilitaria a penetração do novo sorotipo viral nos macrófagos. No entanto, tem-se observado que outros fatores também podem estar relacionados com as manifestações clínicas graves, tais como virulência das cepas do agente, coexistência de outras doenças (comorbidade), fatores genéticos e estado nutricional (HALSTEAD, 2006; BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

Na dengue não existe proteção dos suscetíveis para imunização, apesar de todos os esforços de pesquisa para a produção e desenvolvimento de uma vacina (TAUIL, 2001). Uma vacina ideal deveria proteger, simultaneamente, contra os quatro sorotipos, não causando o fenômeno de facilitação dos anticorpos na penetração viral em macrófagos, além de manter um equilíbrio entre a imunogenicidade e a patogenicidade. Entretanto, mesmo com uma vacina eficaz, muitas questões deverão ser solucionadas, a exemplo, o número de doses da vacina produzida para imunizar milhões de pessoas, capacidade de produção do fabricante, intervalos entre doses necessários para conferir imunidade e custos (FIGUEIREDO *et al.*, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

1.3 Dengue no Brasil e no Estado do Paraná

No final de 1981 e início de 1982 foi detectada a ocorrência de um surto de dengue em Boa Vista (Roraima), com a entrada dos sorotipos 1 e 4 (OSANAI *et al.*, 1983). Em 1986 foi registrada a epidemia de dengue no Brasil com a reintrodução do sorotipo DENV-1 no Estado do Rio de Janeiro. Em 1990 ocorreu a entrada do DENV-2 resultando na disseminação dos sorotipos em todo o País. DENV-3 foi isolado pela primeira vez em dezembro de 2000 no município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2005). Mais recentemente (2010), após 28 anos foi registrada a reintrodução do DENV-4 no Brasil pelo Estado de Roraima (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Nos últimos 20 anos o País sofreu com quatro grandes epidemias 1998, 2002, 2008 e 2010, todas elas devido à mudança do sorotipo viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Entre

2000 a 2005 o Brasil foi responsável por 70% dos casos de dengue nas Américas (SIQUEIRA JR *et al.*, 2005). De 1995 a 2009, a região Sul do Brasil contribuiu com 1,55% (74.253) dos casos de dengue ocorridos no País (Secretaria de Estado de Saúde/ SINAN, 2009).

No Estado do Paraná os primeiros registros de casos de dengue ocorreram em 1993. Em 1995 foi registrada a primeira epidemia. Entre 1995 a 2009 o Paraná foi responsável por aproximadamente 96,5% (71.636) dos casos de dengue na região Sul. Sendo que a maior epidemia no Estado foi em 2007 com 27.196 casos de dengue (Secretaria de Estado de Saúde/ SINAN, 2009).

Em 1995 foram registradas no Paraná epidemias com os sorotipos DENV-1 e DENV-2. Em 2002 inicia-se a circulação do DENV-3. Atualmente, três sorotipos circulam no Estado em casos autóctones. O DENV-4 já foi registrado no Paraná em casos importados (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BALANÇO DENGUE, 2011). A distribuição dos casos no Paraná apresenta-se bastante heterogênea, com forte concentração dos casos registrados de dengue na região Norte do Estado, onde estão inseridas as mesorregiões Oeste, Centro-Oeste, Noroeste, Norte Central e Norte Pioneiro (DUQUE *et al.*, 2011).

1.4 Justificativa

Detectar a sequência das cepas do vírus dengue em determinada região é de fundamental importância. A variação genética entre os genótipos poderia ser responsável pelas diferenças nas interações dos vírus com os macrófagos e sugerem que certas cepas sejam mais virulentas do que outras (GUZMÁN & KOURÍ, 2002). A virulência da cepa também está associada aos casos graves da doença. Possíveis mutações podem interferir no processo de interação tanto do vírus com o hospedeiro humano quanto do vírus e do vetor. Além disso, quando identificamos as cepas circulantes conhecemos também aquelas que foram responsáveis pelas epidemias, podendo fornecer subsídios para o desenvolvimento de vacinas, além de traçar rotas de origem e dispersão do vírus.

2 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genética do fragmento da junção do gene capsídeo/pré-membrana do vírus dengue em amostras de pacientes positivos no Estado do Paraná.

2.1 Objetivos específicos

1. Detectar as cepas do vírus dengue circulantes no Estado do Paraná em 2010.
2. Realizar a análise filogenética das cepas isoladas no Paraná e outras sequências depositadas no GenBank.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As amostras foram cedidas pelo Laboratório Central do Paraná e consistiam em isolados de cultura de células da linhagem C6/36 (*Aedes albopictus*), positivas para o vírus dengue, e com os sorotipos detectados pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). As amostras de sangue humano foram coletadas no mês de março a maio de 2010 de casos autóctones ocorridos no Estado do Paraná. Até junho de 2010 ocorreram 15.012 casos autóctones de dengue em 147 (37%) municípios do Paraná (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2010). Os municípios pertenciam à região Oeste do Estado do Paraná (Foz do Iguaçu, 25°32'48"S, 54°35'17"O; São Miguel do Iguaçu, 25°20'49"S, 54°14'20"O; Realeza, 25°48'45"S, 53°33'45"O; Toledo, 24°41'15"S, 53°41'15"O; Pato Bragado, 24°41'15"S, 54°11'15"O; Nova Aurora, 24°33'45"S, 53°18'45"O) e a região Norte (Maringá, 23°26'15"S, 51°56'15"O; Assaí, 23°18'45"S, 50°48'45"O; Planaltina do Paraná, 23°03'45"S, 52°56'15"O; Sertanópolis, 23°03'45"S, 51°03'45"O; Alvorada do Sul, 22°48'45"S, 51°11'15"O) (Figura 1).

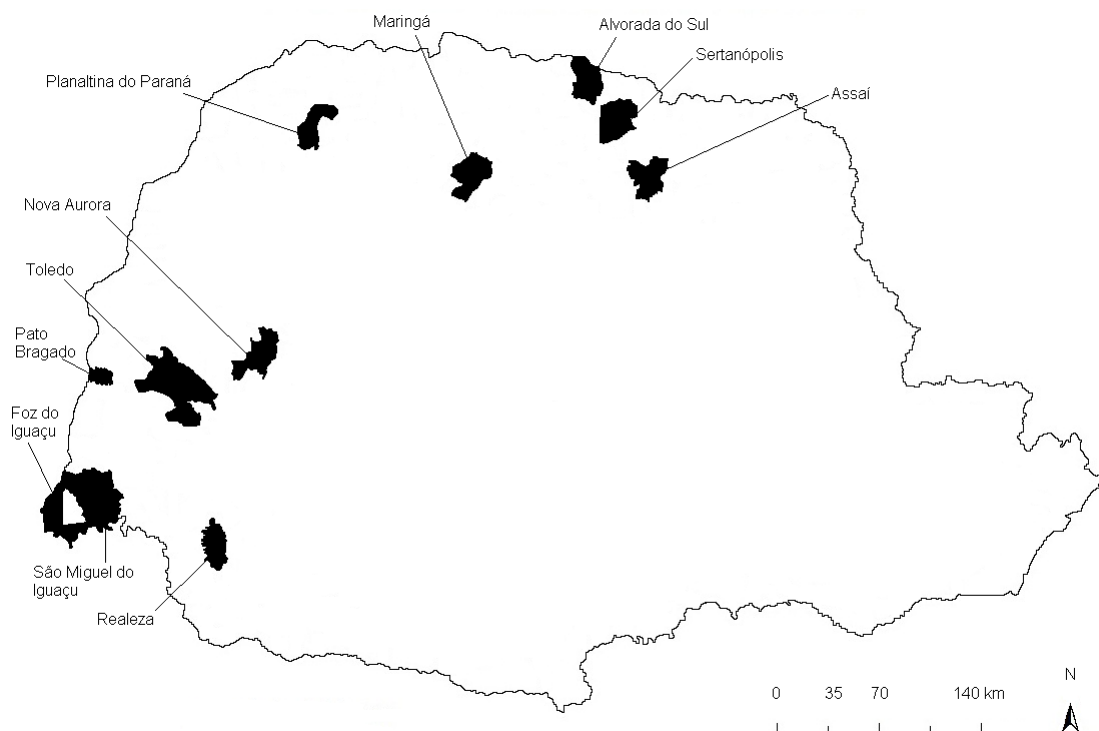


Figura 1. Municípios do Estado do Paraná (Brasil) onde foram analisadas amostras de sangue de pacientes positivos para o vírus dengue.

3.2 Extração do RNA viral e transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para extração do RNA do sobrenadante de células foi utilizado o kit QIAamp® Viral Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA), segundo o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop®. Os RNAs eluídos foram mantidos em freezer -70°C até serem utilizados.

Os iniciadores (IDT, Coralville, IA, USA) utilizados seguiram Lanciotti *et al.* (1992) (Tabela II). O RT-PCR foi de acordo com Singh *et al.* (2008) modificado e Lanciotti *et al.* (1992). Como controle negativo foi utilizado água. Para obtenção do cDNA, 2000 ng do RNA viral e 50 pmoles do iniciador D2 foram colocados no termociclador por 5 minutos a 70°C . Após, a amostra foi mantida em gelo e foi adicionado 5 μL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 50 mM MgCl_2 , 2,5 mM espermidina e 50 mM DTT), dNTP 200 μM (Amresco, Solon, OH), 20 U de AMV transcriptase reversa (Promega Madison, WI), completando com água ultrapura tratada com DEPC 0,1% para o volume final de 25 μL . A amostra foi mantida em termociclador por 90 min a 42°C e 15 min a 70°C .

Para a reação de amplificação, foram colocados 3 μL de cDNA, 2,5 μL do tampão 10X (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM de DTT, 0,5% de Tween®, 20,50% de glicerol), 20 pmoles do iniciador D1, 20 pmoles do iniciador D2, MgCl_2 1,5 mM, dNTP 200 μM (Amresco, Solon, OH), 3 U de Amplitaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), completando com água ultrapura tratada com DEPC 0,1% para 25 μL . A reação foi submetida a 35 ciclos térmicos utilizando os seguintes parâmetros 94°C por 30s, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min.

Para a reação de *nested* PCR, foram colocados uma alíquota de 3 μL da primeira reação de amplificação não diluída ou diluída 1:100, 2,5 μL do tampão 10X, 20 pmoles dos iniciadores D1, TS1, TS2, TS3, TS4, MgCl_2 1,5 mM, dNTP 200 μM (Amresco, Solon, OH), 3 U de Amplitaq Gold DNA polimerase (Perkin Elmer Applied Biosystems), completando com água ultrapura tratada com DEPC 0,1% para 25 μL . A reação foi realizada seguindo os seguintes parâmetros 20 ciclos térmicos de 94°C por 30s, 55°C por 1min e 72°C por 2 min.

O resultado da amplificação foi avaliado através de eletroforese de uma alíquota de 6 μL da amostra em gel de agarose 2% em tampão de corrida TBE 1X (Tris-HCl 90 mM pH 8,0; EDTA 2,5 mM pH 8,0; ácido bórico 90 mM).

Tabela II. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do vírus do dengue e dos seus respectivos sorotipos, de acordo com Lanciotti *et al.* (1992).

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplificado (pb)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG-3'	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	482
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	119
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	290
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	392

3.3. Purificação e sequenciamento

A reação de purificação do produto amplificado com os indicadores D1 e D2 foi realizada com o Qiaquick® PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), segundo instruções do fabricante. As amostras foram encaminhadas para Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo-São Paulo) para sequenciamento utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.4 Análises das sequências

As sequências consenso foram obtidas no Staden Package (STADEN *et al.*, 2001), o alinhamento foi realizado no BioEdit versão 7.0.0 (HALL, 2004), ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). As sequências nucleotídicas das amostras do presente estudo foram comparadas com 39 sequências depositadas no GenBank. (Tabela III) A análise filogenética foi realizada com o método Neighbor-Joining utilizando o programa Mega 4 (TAMURA *et al.*, 2007), com o modelo Kimura 2 parâmetros e 1000 replicações de *bootstrap*.

Tabela III. Distribuição geográfica, código de acesso ao GenBank e ano de isolamento das cepas do vírus dengue encontradas no presente trabalho e das cepas selecionadas no GenBank para análise filogenética.

Sorotipo	Amostra	Ano de isolamento	Localidade	País
DENV-1	*JN086990	2010	Foz do Iguaçu/Paraná	Brasil
	*JN086991	2010	Planaltina do Paraná/Paraná	Brasil
	AF311956	1997	Pernambuco	Brasil
	AF311956	1997	Pernambuco	Brasil
	AF514885	2000	Libertad/Misiones	Argentina
	AF513110	2001	Paraná	Brasil
	AB519681	2001	Brasília/Distrito Federal	Brasil
	GQ868570	2008	Santander	Colômbia
	JF937644	2009	Manágua	Nicarágua
	HQ166037	2008	Yucatán	México
	HQ026760	1986	-	Brasil
	EU518605	2008	-	Guiana Francesa
	FJ850103	2008	Aragua	Venezuela
	EU482591	2006	-	Porto Rico
	AF514878	2000	Lambaré/Central	Paraguai
	FJ850090	2007	Região Norte	Brasil
	FJ850084	2005	Região Norte	Brasil
	HQ026762	2010	Rio de Janeiro	Brasil
	GU131863	2008	São Paulo	Brasil
	EF457905	1972	-	Malásia
	AB195673	2003	-	Japão
	AF180817	-	-	-
	AF309641	-	-	Camboja
DENV-2	*JN086992	2010	Pato Bragado/Paraná	Brasil
	HQ012528	2008	Rio de Janeiro	Brasil
	EU076554	2007	-	Paraguai
	HQ012526	2007	Rio de Janeiro	Brasil
	FJ898453	2005	-	Ilhas Virgens
	HM181971	2008	São Paulo	Brasil
	HQ012529	2009	Bahia	Brasil
	AB122022	2001	-	República Dominicana
	GQ199892	2007	-	Jamaica
	EU518604	2006	Camp du Tigre	Guiana Francesa
	HQ012531	2010	Rio de Janeiro	Brasil
	FJ639822	2006	Aragua	Venezuela
	EU687216	2005	-	Porto Rico
	FJ024477	2004	Antioquia	Colômbia
	FJ898439	2008	Chiapas	México
	HQ541792	2008	Manágua	Nicarágua
	AF276619	-	Província de Fujian	China
	AF100465	1987	Maracay/Aragua	Venezuela
	AJ487271	1974	-	Tailândia
	AF204178	1987	Província de Guangxi	China

* Amostras isoladas no presente trabalho.

4 RESULTADOS

Foram analisadas uma amostra positiva para o vírus dengue de cada município, por imunofluorescência indireta. Todas as amostras foram positivas para o RT-PCR, destas três estavam infectadas com DENV-2, quatro com DENV-1 e quatro positivas para ambos os sorotipos (DENV-1 e 2). Quando as amostras dos municípios de Pato Bragado, Realeza foram amplificadas pela técnica RT-PCR sem diluição, foram visualizadas no gel duas bandas de intensidade diferentes, sugerindo os sorotipos com maior e menor número de cópias. No entanto, quando o produto amplificado foi diluído 100 vezes, apenas uma banda foi detectada de 119 pb, evidenciando o sorotipo DENV-2 como predominante. As amostras provenientes dos municípios São Miguel do Iguaçu e Nova Aurora apresentaram os dois sorotipos (DENV-1 e 2) mesmo quando foram diluídas (Tabela IV; Figura 2).

Tabela IV. Amostras de pacientes de 11 municípios do Estado do Paraná (Brasil), infectadas com o vírus do dengue e detectadas por RT-PCR e imunofluorescência indireta (IFI).

Localidade	Amostras	RT-PCR		IFI*
		Não diluído	Diluído 1/100	
Região Norte	Maringá	DENV-2	DENV-2	DENV-2
	Assaí	DENV-1	DENV-1	DENV-1
	Planaltina do Paraná	DENV-1	DENV-1	DENV-1
	Sertanópolis	DENV-1	DENV-1	DENV-1
	Alvorada do Sul	DENV-2	DENV-2	DENV-2
Região Oeste	Pato Bragado	DENV-1/DENV-2	DENV-2	DENV-2
	Realeza	DENV-1/DENV-2	DENV-2	DENV-2
	Toledo	DENV-2	DENV-2	DENV-2
	São Miguel do Iguaçu	DENV-1/DENV-2	DENV-1/DENV-2	DENV-1
	Nova Aurora	DENV-1/DENV-2	DENV-1/DENV-2	DENV-1
	Foz do Iguaçu	DENV-1	DENV-1	DENV-1

* Dados cedidos pelo LACEN/PR

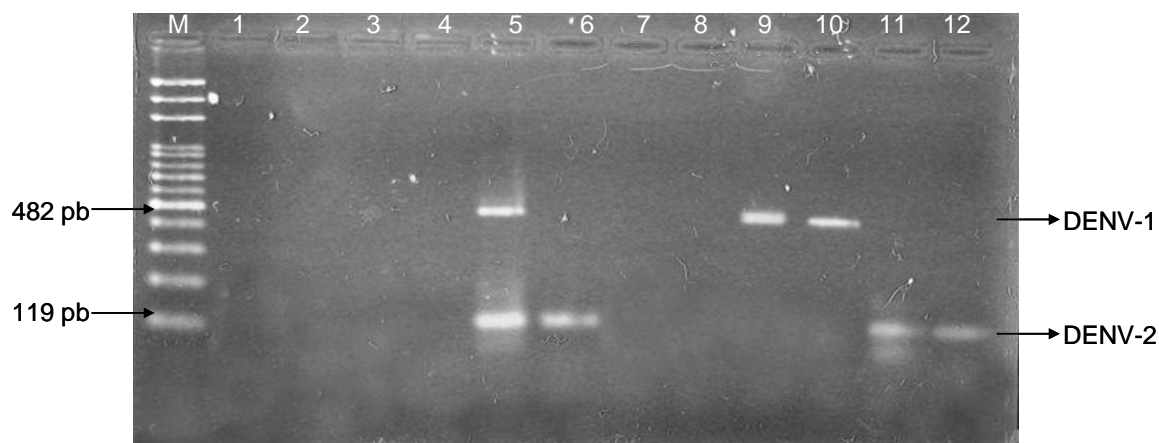


Figura 2. Amplificados obtidos pela reação de RT-PCR para a detecção dos sorotipos virais 1 e 2 das amostras dos municípios do Paraná. M: 100-bp Marcador molecular (Amresco Solon, Ohio); 1 a 4 amostras não amplificadas; 5: Amostra sem diluição de Pato Bragado, co-infecção por DENV-1 e DENV -2; 6: Amostra diluída de Pato Bragado, co-infecção por DENV -2 ; 7-8: Controle negativo; 9: Amostra sem diluição de Foz do Iguaçu infectada por DENV -1; 10: Amostra diluída de Foz do Iguaçu infectada por DENV -1; 11: Amostra sem diluição de Maringá infectada por DENV -2; 12: Amostra diluída de Maringá infectada por DENV -2.

Para análise da variação genética das cepas foram sequenciadas cinco amostras, provenientes dos seguintes municípios: Planaltina do Paraná, Sertanópolis, Alvorada do Sul, Pato Bragado, e Foz do Iguaçu.

Na análise do fragmento obtido de 368 pb do fragmento da junção do gene CprM, foram encontrados duas cepas para o DENV-1 com 14 sítios polimórficos. Em Foz do Iguaçu e Sertanópolis foi encontrado a cepa JN086990 (GenBank), e em Planaltina do Paraná a cepa JN086991 (GenBank). As cepas de DENV-1 foram distinguidas por 13 transições: G↔A (sítios 207, 351); T↔C (sítios 081, 267, 306, 309, 360); A↔G (sítios 180); C↔T (sítio 069, 276, 297, 350, 354), e uma transversão: G↔C (sítio 264). Foram observadas duas mudanças nos códons 69 (Met→Ile) e no códon 117 (Ala→Val) do DENV-1, correspondentes a três substituições nos nucleotídeos 207, 350 e 351 (Tabela V).

Na análise do fragmento obtido de 360 pb do fragmento da junção do gene CprM, foi encontrada uma cepa para o DENV-2, provenientes dos municípios de Alvorada do Sul e Pato Bragado (GenBank: JN086992).

Para o DENV-1, a similaridade variou de 95% a 100% comparada às cepas do GenBank. Para o DENV-2 a similaridade variou de 98% a 100%. De acordo com o cladograma gerado, todas as cepas deste estudo se agruparam no genótipo V para DENV-1. Em relação ao DENV-2 foi encontrada a cepa referente ao genótipo Asiático/Americano. (Figuras 3 e 4).

Tabela V. Mudanças nucleotídicas encontradas nas sequências do sorotipo 1 do vírus dengue no Estado do Paraná.

Cepas DENV-1	Posições das mudanças nucleotídicas													
	0	0	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
	6	8	8	0	6	6	7	9	0	0	5	5	5	6
	9	1	0	7	4	7	6	7	6	9	0	1	4	0
JN086990	C	T	A	G	G	T	C	C	T	T	C	G	C	T
JN086991	T	C	G	A	C	C	T	T	C	C	T	A	T	C

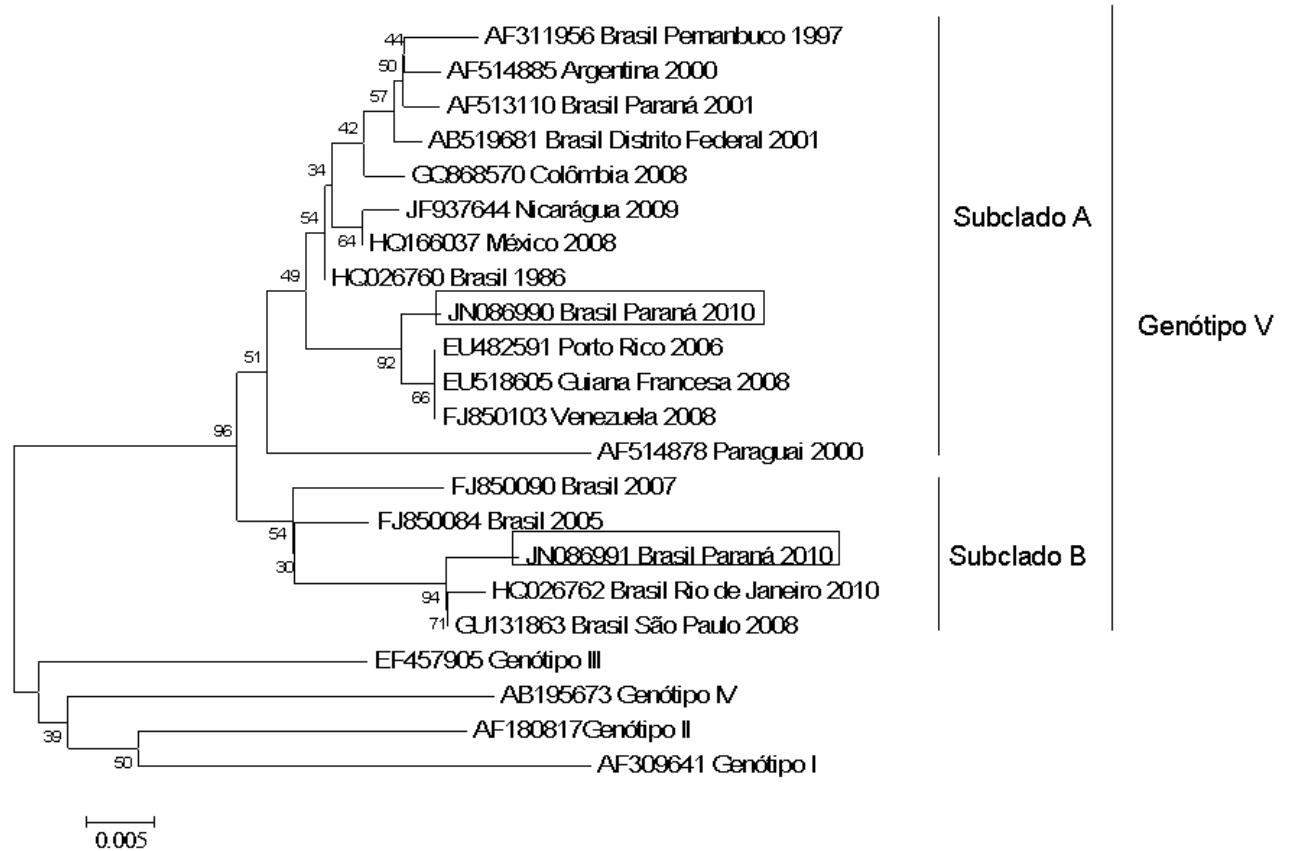


Figura 3. Análise filogenética com o método Neighbor-Joining do fragmento da região do gene CprM do DENV-1 e das sequências obtidas no GenBank. Os valores de *bootstrap* (calculado após 1000 réplicas) para o método de Kimura 2 parâmetros, encontram-se acima do nó de cada grupo principal.

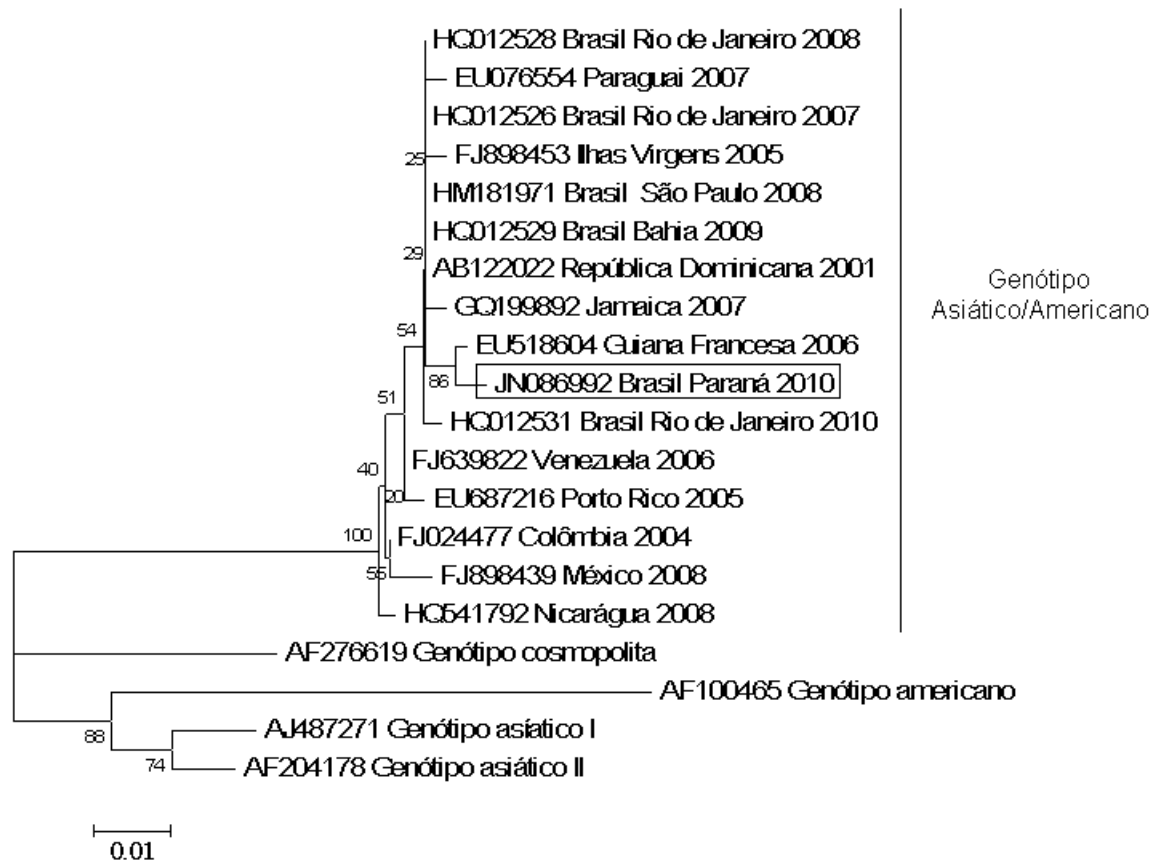


Figura 4. Análise filogenética com o método Neighbor-Joining do fragmento da região do gene CprM do DENV-2 e das sequências obtidas no GenBank. Os valores de *bootstrap* (calculado após 1000 réplicas) para o método de Kimura 2 parâmetros, encontram-se acima do nó de cada grupo principal.

5. DISCUSSÃO

Em áreas hiperendêmicas, com múltiplos sorotipos circulantes, é comum a co-infecção por sorotipos do vírus dengue (GUBLER, 1998; WANG *et al.*, 2003), especialmente em regiões com elevada densidade de vetores e hospedeiros suscetíveis ao vírus. No Brasil, a infecção dupla por DENV-1 e DENV-2 em humanos, já tinha sido relatada por Rocco *et al.* (1998), Santos *et al.* (2003) e Cunha *et al.* (2008). No Paraná, este é o primeiro relato de co-infecção na literatura. Infecções simultâneas por diferentes sorotipos do vírus dengue também têm sido relatadas em mosquitos adultos (CÁCERES *et al.*, 2003). As fêmeas de *Aedes aegypti* são capazes de transmitir mais de um arbovírus simultaneamente (ROCCO *et al.*, 1998).

No presente trabalho apenas a técnica RT-PCR mostrou-se mais sensível na detecção da dupla infecção. Utilizando apenas o método de imunofluorescência indireta os sorotipos poderiam ter sido subestimados.

De acordo com Rico-Hesse *et al.* (1990), genótipos do mesmo sorotipo apresentam uma taxa de divergência no máximo de 6% em suas sequências nucleotídicas. As duas cepas de DENV-1 analisadas nesse estudo mostraram um elevado grau de identidade nucleotídica com o genótipo V, o único que circula no Brasil até o momento.

As cepas de DENV-1 isoladas neste trabalho estão agrupadas em ramos filogenéticos divergentes do genótipo V, mostrando uma segregação na formação dos subclados A e B com 96% de *bootstrap*. No subclado A, a cepa do DENV-1 encontrada em Foz do Iguaçu e Sertãoópolis (GenBank: JN086990) mostrou-se mais relacionada com as cepas da Guiana Francesa (GenBank: EU482591), Venezuela (GenBank: EU518605) e Puerto Rico (GenBank: FJ850103), do que com as cepas brasileiras. A dispersão do vírus dengue pode ocorrer através da movimentação de viajantes infectados de uma região para outra. Municípios que compartilham fronteiras com outros países e apresentam intenso fluxo de pessoas como Foz do Iguaçu, podem ser mais vulneráveis a entrada de novos genótipos do vírus.

No subclado B a cepa do DENV-1 encontrada em Planaltina do Paraná (GenBank: JN086991) está relacionada com as cepas brasileiras isoladas em 2008 (GenBank: GU131863) e 2010 (GenBank: HQ026762). Em 2001, Santos *et al.*

(2002) sequenciaram uma cepa do Paraná de DENV-1 diferente das encontradas neste trabalho. Esses dados evidenciam a diversidade genética das cepas do DENV-1 encontrada no Estado.

As substituições dos aminoácidos metionina por uma isoleucina (aa 69) e alanina por uma valina (aa 117) identificadas na cepa JN086991 do DENV-1 também foram encontradas nas cepas do Rio de Janeiro (GenBank: HQ026762) e São Paulo (GenBank: GU131863). Essas substituições ocorreram para aminoácidos de mesmo caráter bioquímico, não alterando a hidrofobicidade da proteína na região da junção do gene CprM (SINGH & SETH, 2001). Mutações no genoma do vírus podem aumentar ou diminuir a virulência da cepa (LEITMEYER *et al.*, 1999). No entanto até o momento, não existem evidências na literatura entre a associação de diferentes cepas do DENV-1 relacionadas com casos graves da doença.

A cepa de JN086992 do DENV-2 analisada, está relacionada ao genótipo Asiático/Americano com 100% de valor de *bootstrap*, mais semelhante à cepa da Guiana Francesa (GenBank: EU518604) isolada em 2006. O genótipo Americano tem sido associado a cepas de menor virulência. Este genótipo parece ter sido deslocado pelo importado (sudeste asiático), uma vez que não houve isolamento do primeiro em áreas onde o último está circulando. Existem indicações que a cepa Sudeste Asiática foi responsável pelos casos graves de dengue ocorridos nas Américas. Em 19 anos de circulação (1991 a 2008) o DENV-2 genótipo Asiático/Americano foi predominante em todo o Brasil (RICO-HESSE *et al.*, 1997; CRUZ *et al.* 2010).

Estudos evolutivos têm revelado que a diversidade genética do vírus da dengue está aumentando, sendo a mutação o processo responsável por este aumento. A diversidade genética do vírus dengue também pode ser gerada por recombinação. Para isso acontecer, diferentes genótipos de um mesmo sorotipo viral, tem que co-infectar o mesmo indivíduo. Os genomas que infectaram a mesma célula podem formar uma molécula híbrida de RNA. Infecção simultânea de *Aedes aegypti* por diferentes vírus durante surtos e epidemias, resulta em elevada taxa de replicação viral, permitindo o surgimento de mudanças genéticas. O aumento da diversidade genética do vírus da dengue pode ter consequências graves, como a expansão de propriedades patogênicas, ou seleção de cepas para o aumento da transmissibilidade, viremia e virulência (WOROBNEY *et al.*, 1999; HOLMES & BURCH 2000; WEAVER & VASILAKIS 2009).

O monitoramento contínuo da introdução de novos genótipos em determinada localidade é necessário para que medidas de controle sejam implementadas a fim de reduzir o risco potencial de epidemias associadas a cepas virulentas (PIRES-NETO *et al.*, 2005). Além disso, o conhecimento do genótipo do vírus dengue que circula em determinada região é importante, pois apresenta implicações para o desenvolvimento de vacinas (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2004), além de monitorar eventos genéticos, movimentação geográfica e origem das cepas.

6 CONCLUSÕES

1. Co-infecção por DENV-1 e DENV-2 foi detectada em quatro pacientes no Estado do Paraná, através da técnica de RT-PCR.
2. A análise revelou duas cepas do DENV-1 pertencentes ao genótipo V, e uma cepa do DENV-2 referente ao genótipo Asiático/Americano circulantes no Estado do Paraná.
3. A análise filogenética demonstrou que as cepas DENV-1 do genótipo V apresentaram-se como um grupo monofilético, o mesmo foi observado para cepa do DENV-2 do genótipo Asiático/Americano.

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA-BAS, C.; GÓMEZ-CORDERO, I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. **Revista Biomédica**, v. 16, p.113-137, 2005.

ANOOP, M.; ISSAC, A.; MATHEW, T.; PHILIP, S.; KAREEM, N. A.; UNNIKRIISHNAN, R.; SREEKUMAR, E. Genetic characterization of dengue virus serotypes causing concurrent infection in an outbreak in Ernakulam, Kerala, South India. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 849-857, 2010.

ARAÚJO, J. M.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAY, R H. G.; ZANOTTO, P. M.; BELLO, G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 716-725, 2009.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Cadernos de Estudos Avançados**, v. 22, p. 53-72, 2008.

BRICKS, L. F. Vacinas para a dengue: perspectives. **Pediatria**, v. 26, p. 268-81, 2004.

CÁCERES, R. O. Detección rápida de los serotipos del virus dengue en el mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 20, p. 156-158, 2003.

CRUZ, A. C. R; GALLER, R.; SILVA, E. V. P; SILVA, M. O.; CARNEIRO, A. R.; ROSA, E. S. T.; VASCONCELOS, H. B.; SÁ, E. L. R.; VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 isolated in Brazil from 1991 to 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, p. 25-34, 2010.

CUNHA, A. M. M.; CAIAFFA, W. T.; OLIVEIRA, C. D. L.; KROON, E. G.; PESSANHA, J. E. M.; LIMA, J. A.; PROIETTI, F. A. Fatores associados à infecção pelo vírus dengue no município de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Brasil: características individuais e diferenças intra-urbanas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, p. 217-230, 2008.

DUQUE, L. J. E.; DA SILVA, R. V.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO- SILVA, M. A. Dengue no Estado do Paraná, Brasil: distribuição temporal e espacial no período 1995-2007. **Salud UIS**, v. 42, p.113-122, 2010.

FIGUEIREDO, L. T. M. Vacinas contra o dengue. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 32, p. 21-25, 1999.

_____. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 224-229, 2007.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **Clinical review**, v. 324, p. 1563-1566, 2002.

GONCALVEZ, A. P.; ESCALANTE, A. A.; PUJOL, F. H.; LUDERT, J. E.; TOVAR, D.; SALAS, R. A.; LIPRANDI, F. Diversity and Evolution of the Envelope Gene of Dengue Virus Type 1. **Virology**, v. 303, p. 110–119, 2002.

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

_____. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 319-330, 2004.

GUSMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 480-496, 1998.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 6, p. 407–15, 2006.

HENCHAL, E. A.; PUTNAKO, R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 376-396, 1990.

HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 74-77, 2000.

ITO, M.; TAKASAKI, T.; KOTAKI, A.; TAJIMA, S.; YUWONO, D.; RIMAL, H. S.; DOS SANTOS, F.; DE JESUS, M. D.; LINA, B. B.; TSUDA, Y.; LIM, C. K.; NEROME, R.; CALERÉS, A.; SHINDO, N.; DRAGER, R. D.; JAPARIDZE, A.; KURANE, I.. Molecular and virological analyses of dengue virus responsible for dengue outbreak in East Timor in 2005. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p.181-184, 2010.

KUKRETI, H.; CHAUDHARY, A.; RAUTELA, R. S.; ANAND, R.; MITTAL, V.; CHHABRA, M.; BHATTACHARYA, D.; LAL, S.; RAI, A. Emergence of an independent lineage of dengue virus type 1 (DENV-1) and its co-circulation with predominant DENV-3 during the 2006 dengue fever outbreak in Delhi. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 542-549. 2008.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, p. 545-551, 1992.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; DENNIS, W. Trent. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2279–2286, 1997.

LEWIS, J. A.; CHANG, G. J.; LANCIOTTI, R. S.; KINNEY, R. M.; MAYER, L. W.; TRENT, D. W. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, v. 197, p. 216-24, 1993.

LEITMEYER, K. C., DE CHACON, VAUGHN, D. W., WATTS, D. M., SALAS, R., CHACON, I. V., RICO-HESSSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, p. 4738-4747, 1999.

LOROÑO-PINO, M. A.; CROPP, C. B., FARFÁN, J. A.; VORDAN, A. V.; RODRÍGUEZ-ÁNGULO, E. M.; ROSADO-PAREDES, E. P.; FLORES-FLORES, L F.; BEATY, B. J.; GUBLER, D. J. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotype. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 725-730, 1999.

MARCONDES, C. B.; TAUIL, P. L. Dengue silvestre: devemos nos preocupar? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 263-264, 2011.

MIAGOSTOVICH, M. P.; DOS SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R. Molecular Characterization of Brazilian Dengue Viruses. **Dengue Bulletin**, v. 28, p. 151-160, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**, 21 p., 2002.

_____, 2010. Nota técnica **Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_denv_4_24_09_2010_eh.pdf. Acesso em 01/12/2011.

_____, 2011. **Cartilha dengue**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html. Acesso em 14/12/2011.

_____, 2011. **Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf. Acesso em 02/03/2012.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; DE FILIPPIS, A. M.; DOS SANTOS, F. B.; DA CUNHA, R. V.; COELHO, J. O.; DE SOUZA, L. J.; GUIMARÃES, F. R.; DE ARAÚJO, E. S.; DE SIMONE, T. S.; BARAN, M.; TEIXEIRA, G. JR.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue Virus type3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1376-1381, 2005.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A.; AMARAL, S.; PASSOS, A. C. D.; TAUIL, P. L. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 1, p. 53-54, 1983.

PANDEY, B. D.; MORITA, K.; HASEBE, F.; PARQUET, M. C.; IGARASHI, A. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v. 31, p. 66-72, 2000.

PIRES NETO, R. J., LIMA, D. M., DE PAULA, S. O., LIMA, C. M., ROCCO, I. M., FONSECA, B. A. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p.: 843-52, 2005.

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

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

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; MESA, M. T. R.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 23, p. 244-251, 1997

ROCCO, I. M.; BARBOSA, M. L.; KANOMATA, E. H. N. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a brazilian patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 151-154, 1998.

ROMANOS, M. T. V. Febre amarela e dengue. In: SANTOS, N. S. O.; Wigg, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., v. 1, p. 399-409, 2008.

SANTOS, C. N. D.; ROCHA, C. F. S.; CORDEIRO, M.; FRAGOSO, S. P.; REY, F.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Research**, v. 90, p. 197-205, 2002.

SANTOS, C. L. S.; BASTOS, M. A. A.; SALLUM, M. A. M.; ROCCO, I.M. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 11-16, 2003.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2010. **Boletim informativo dengue n.º 6/2010**. Superintendência de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://www.paranacontradengue.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=3>. Acesso em 11/12/2011.

_____, 2009. **Sistema de informação de agravos de notificação/ SINAN**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_dengue_bra_gr_uf_97_09.pdf>. Acesso em 14/12/2011.

SINGH, U. B.; SETH, P. Use of nucleotide sequencing of the genomic cDNA fragments of the capsid/premembrane junction region for molecular epidemiology of dengue type 2 viruses. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v. 32, p. 326-335, 2001.

SINGH, N.; SHARMA, K. A.; DADHWAL, V.; MITTAL, S.; SELVI, A. S. A successful management of dengue fever in pregnancy: report of two cases. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, p. 377-380, 2008.

SIQUEIRA-JR, J. B.; MARTELLI, C. M. T.; COELHO, G. E.; SIMPLICIO, A. C. R.; HATCH, D. L. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.1, p. 48-53, 2005.

STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Sequence assembly and finishing methods. **Analytical Biochemistry: Methods**, v. 43, p. 303–322, 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, M. L. E o dengue continua desafiando e causando perplexidade. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 828-828, 2011.

THOISY, B.; DUSSART, P.; KAZANJIA, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 409-412, 2004.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 4673-4680, 1994.

WANG, W. K.; CHAO, D. Y.; LIN, S. R.; KING, C. C.; CHANG, S. C. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p. 89-95, 2003.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 523–540, 2009.

WOROBAY, M.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E.C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 7352–7357, 1999.

ZHANG, J. L.; JIAN, R.; WAN, Y. J.; PENG, T.; AN, J. Identification and Phylogenetic Analysis of DEN-1 Virus Isolated in Guangzhou, China, in 2002. **Dengue Bulletin**, v. 28, p. 135-144, 2004.

CAPÍTULO II

VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA E DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE (*FLAVIVIRUS, FLAVIVIRIDAE*) EM VETORES

RESUMO

Aliando procedimentos de vigilância entomológica com a detecção do vírus no vetor, podemos avaliar a presença ativa do vírus dengue no tempo e espaço, bem como os novos sorotipos circulantes em uma determinada região. Os objetivos do presente estudo foram: I) Avaliar a infestação de fêmeas de *Aedes aegypti*, de ovos de *Aedes (Stegomyia)* sp. e a incidência de casos de dengue nos diferentes estratos do município de Foz do Iguaçu; II) Detectar o vírus dengue em populações naturais de *A. aegypti* e *Aedes albopictus*; III) Avaliar a armadilha Adultrap® como ferramenta para detecção do vírus dengue em vetores; IV) Investigar a transmissão transovariana em populações naturais de *A. aegypti*. As coletas foram realizadas pelo Centro de Controle de Zoonoses no município de Foz do Iguaçu, que foi dividido em 11 estratos. Para cada dos estratos foram instaladas 450 armadilhas Adultrap® e 15 armadilhas ovitrampas, durante sete coletas de dezembro de 2008 a outubro de 2010. Os adultos criados a partir das ovitrampas e os provenientes da armadilha Adultrap®, foram triados em mesa refrigerada a -20°C e avaliados através da técnica RT-PCR para presença do vírus dengue. Entre novembro de 2010 e maio de 2011 foram instaladas armadilhas Adultrap® em residências de moradores com suspeita de dengue. Os mosquitos adultos coletados foram analisados pela técnica de RT-PCR e pela detecção do antígeno NS1. Esta técnica foi realizada pelo Laboratório de Transmissores de Hematozoários do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). De acordo com os dados bioecológicos observamos que todos os estratos do município de Foz do Iguaçu encontram-se infestados pelo *A. aegypti*, e quando ocorre epidemia de dengue todos os estratos apresentaram elevada incidência da doença. Em relação a detecção viral, foram analisados 322 *pools* (2418 *A. aegypti*) pela técnica RT-PCR, destes cinco *pools* de fêmeas congeladas vivas estavam infectadas com os sorotipos 1 e/ou 2 do vírus dengue em períodos de baixa incidência da doença. Já nos mosquitos que estavam mortos na armadilha, não foi detectado vírus dengue. Não foi detectado *A. albopictus* infectados com o vírus dengue e nem transmissão transovariana para *A. aegypti*. Foram avaliados 31 *pools* de 223 fêmeas de *A. aegypti* coletadas nas residências de moradores com suspeita de dengue, com armadilha Adultrap®. Não foi encontrado nenhum *pool* positivo para o vírus dengue pela técnica de RT-PCR, mas através da detecção do antígeno NS1 foram encontrados sete *pools* infectados. A armadilha Adultrap® foi uma ferramenta eficaz para detecção do vírus dengue em mosquitos, pois detectou *pools* infectados mesmo em períodos de baixa transmissão de dengue. Além de apresentar especificidade para capturar fêmeas de *A. aegypti* e estas permanecerem vivas na armadilha.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. RT-PCR. NS1. Transmissão transovariana. Transmissão horizontal. Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Combining entomological surveillance procedures to detect the virus in the vector, we can evaluate the active presence of the dengue virus in time and space, as well as new serotype in a given region. The objectives of this study were: I) Evaluate the infestation of females of *Aedes aegypti*, eggs of *Aedes (Stegomyia)* sp. and the incidence of dengue cases in the different strata of the city of Foz do Iguaçu; II) Detect dengue virus in natural populations of *A. aegypti* and *Aedes albopictus*; III) Evaluate the Adultrap® for detection of dengue virus in vectors; IV) Investigate transovarial transmission in natural populations of *A. aegypti*. Samples were collected by the Center for Zoonosis Control in the city of Foz do Iguaçu, which was divided into 11 strata. For each, were installed 450 Adultrap® and 15 ovitraps during seven collections from December 2008 to October 2010. The adults reared from ovitraps and from Adultrap® were screened in the table chilled to -20° C and analyzed by RT-PCR for the presence of dengue virus. Between November 2010 and May 2011 Adultrap® were installed in homes of suspected dengue cases. The adults collected were analyzed by RT-PCR and NS1 antigen detection. This technique was performed by the Laboratory of transmitters hematozoa of Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). According to the bioecological data, it was observed that all strata of the city of Foz do Iguaçu are infested by *A. aegypti* and when dengue epidemic occurred all strata had a high incidence of the disease. For virus detection, we analyzed 322 pools (2418 *A. aegypti*) by RT-PCR technique five of these pools of frozen alive females were infected with serotypes 1 and/or 2 of dengue virus during periods of low incidence of dengue. Since the mosquitoes that were killed in the trap, was not detected dengue virus. There was no detectable *A. albopictus* infected with dengue virus and no transovarial transmission. 31 pools were evaluated of 223 female *A. aegypti* collected from homes with suspected dengue cases, by Adultrap®. We found no pool positive for dengue virus by RT-PCR but, through the detection of NS1 antigen seven infected pools were found. The Adultrap® was an effective tool for detection of dengue virus in mosquito, because detected infected pools in periods of low transmission of dengue, besides present specificity to capture female *A.aegypti* and these remain alive in the trap.

Key words: *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. RT-PCR. NS1. Transovarial transmission. Horizontal transmission. Foz do Iguaçu.

1 INTRODUÇÃO

A dengue, durante o último século, ampliou sua distribuição geográfica e gravidade para se tornar a mais comum infecção por arbovírus em seres humanos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esta pandemia pode ser atribuída a diversos fatores, tais como, intenso processo de urbanização não acompanhado de sustentabilidade ambiental, dispersão geográfica dos vetores, interação e evolução dos quatro sorotipos do vírus, ineficiência de ferramentas de controle, resistência a inseticidas químicos, alocação de recursos para métodos ineficazes (KYLE & HARRIS, 2008; EISEN *et al.*, 2009; ENDY *et al.*, 2010), e escassez de adequada estruturação em educação ambiental.

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é o principal vetor do vírus do dengue nas Américas, embora mosquitos da espécie *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) também apresentem competência vetorial para a arbovirose (ALENCAR *et al.*, 2008).

1.1 Vírus e vetor

A competência do vetor em transmitir um patógeno é resultado da habilidade do vetor se infectar, propiciar a multiplicação e transmissão do agente etiológico ao novo hospedeiro. Atualmente, sabe-se que os mecanismos que conduzem a infecção do vírus dengue no *Aedes aegypti* são influenciados diretamente pelas características genéticas da cepa do vírus e da população de mosquitos. No entanto, se o vetor não coexistir temporalmente e espacialmente com um hospedeiro vertebrado que abrigue o agente etiológico, ou se a fonte de sangue para esta espécie não inclui esse vertebrado, o mosquito não é um vetor oportuno para transmissão do patógeno (FORATTINI, 1992; BEERNTSEN *et al.*, 2000; LAMBRECHTS *et al.*, 2009; LAMBRECHTS, 2011).

Para o vetor tornar-se infectante, os vírus adquiridos durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro virêmico devem alcançar o epitélio do intestino médio, replicar, e atravessar esta barreira principal em direção a hemocele. A replicação do viral e a disseminação acontecem célula a célula no corpo do mosquito e finalmente o vírus alcança o epitélio da glândula salivar. Depois do período de incubação

extrínseco (de 8 a 12 dias), o mosquito infectado pode transmitir o vírus ao hospedeiro vertebrado suscetível pelo resto de sua vida (GUIMARÃES *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004).

Estudo ultraestrutural evidenciou vírus dentro do sistema nervoso, glândulas salivares, intestino anterior e médio, corpo gorduroso, células da epiderme, ovário e parede interna de corpo forrando as células do mosquito. Em contraste, eles estão ausentes nos músculos, intestino posterior e túbulos de Malpighi (MALAVIGE *et al.*, 2007).

O sangue torna-se essencial à maturação dos ovos para as fêmeas anautógenas de Culicidae. Os nutrientes desse sangue complementam as reservas energéticas vindas da fase larvária, iniciando o processo de deposição de vitelo nos folículos ovarianos (RAMASAMY *et al.* 2000; ZHOU *et al.* 2004). O repasto sanguíneo é uma oportunidade ideal para infecção ou transmissão do vírus dengue. No entanto, o vetor tem oportunidade de tornar-se infectado antes mesmo do repasto sanguíneo, através da transmissão transovariana ou transmissão vertical. É possível que a transmissão transovariana represente uma forma de manutenção do vírus dengue na natureza, uma vez pode persistir até a sétima geração nos tecidos dos mosquitos. O vírus dengue não sofre latência no embrião podendo se multiplicar. Após a emergência, o adulto pode transmitir o agente etiológico via transmissão horizontal. No entanto, a multiplicação do vírus em diferentes órgãos durante embriogênese, ou em fases posteriores pode variar para cada mosquito, devido ao tropismo do tecido, cepa viral, e fatores genéticos relacionados ao *Aedes aegypti*. (JOSHI *et al.*, 2002).

Outra forma de infecção do vetor é a transmissão venérea. O macho infecta a fêmea durante a cópula, mas não vice-versa. Esta transmissão pode aumentar a intensidade de transmissão do vírus na natureza (ROSEN *et al.*, 1987; KOW *et al.*, 2001).

1.2 Detecção do vírus dengue em mosquitos

Atualmente, várias técnicas específicas, rápidas e com baixos limiares de detecção do vírus estão disponíveis, cada uma com suas vantagens e limitações. As técnicas mais utilizadas para detecção do vírus dengue em mosquitos são: isolamento viral, técnicas moleculares e detecção do antígeno viral.

1.2.1 Isolamento viral

O isolamento viral é considerado o padrão ouro utilizado na detecção do vírus dengue gerando uma resposta qualitativa (presença ou ausência do vírus) e diferencial. As amostras podem ser quantificadas através da titulação viral. Três métodos de isolamento podem ser utilizados: inoculação intracerebral em camundongo, inoculação em cultura de células de mosquitos e mamíferos, e inoculação intratorácica em mosquitos adultos (AHMED, 2005).

A inoculação em cultura de células de mosquitos tem sido o método mais utilizado e que apresenta vantagens em relação aos outros, tais como: baixo custo, sensibilidade, fácil manutenção da temperatura e do meio de cultura (DE PAULA & FONSECA, 2004; SAMUEL & TYAGI, 2006). As células de *Aedes albopictus* (clone C6/36) têm sido as mais utilizadas para isolamento do vírus dengue na maioria dos laboratórios especializados, pois apresentam elevado grau de suscetibilidade para infecções com arbovírus (WHITE, 1987; WIKAN *et al.*, 2009). A detecção do antígeno viral na cultura de células é realizada por imunofluorescência indireta com anticorpos específicos (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

É difícil a detecção do vírus dengue utilizando a técnica de isolamento viral em mosquitos, mesmo em municípios com elevado número de casos em humanos e altos índices de infestação do vetor. Degallier *et al.* (2003) analisando 23 *pools* de *Aedes aegypti* capturados em Vitória no Estado do Espírito Santo, verificaram apenas uma amostra de DENV-1 positiva. Lourenço-de-Oliveira *et al.* (2002) isolaram DENV-3 em três *pools* de nove fêmeas de *A. aegypti*, a partir de 2.164 indivíduos capturados em Nova Iguaçu (Rio de Janeiro).

O isolamento viral de mosquitos provenientes do campo requer que os exemplares sejam enviados ao laboratório acondicionados em nitrogênio líquido, identificados (até espécie) por profissionais capacitados e mantidos sob condições controladas de temperatura, neste procedimento é necessário a utilização de mesa refrigerada a - 20°C. Após identificação os insetos são armazenados em freezer a - 70°C. A necessidade de laboratório adequado às normas de biossegurança, profissionais capacitados na identificação dos culicídeos, cuidado diário, individualizado com a cultura de células e o longo período gasto até o diagnóstico viral são algumas desvantagens para que esta técnica possa ser aplicada na vigilância virológica em larga escala em mosquitos de campo.

1.2.2 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Tradicionalmente RT-PCR envolve dois ciclos de reação: a transcrição reversa e a amplificação por reação em cadeia da polimerase. Primeiramente o RNA é transcrito em cDNA, utilizando a enzima transcriptase reversa. Este cDNA é amplificado por PCR usando iniciadores específicos. O sorotipo do vírus dengue em questão amplificado pode ser visualizado em gel de agarose, com bandas de diferentes tamanhos. Este método de rotina é utilizado para isolar rapidamente sequências específicas a partir de uma mistura complexa de sequências genômicas ou de cDNAs. É uma técnica qualitativa (presença ou ausência do vírus) que determina os sorotipos do vírus dengue e pode ser finalizada com o sequenciamento do produto amplificado, para verificação do genótipo em questão (ACOSTA-BAS & GÓMEZ-CORDERO, 2005; DE PAULA & FONSECA, 2004).

Diversos protocolos de RT-PCR têm sido descritos para a detecção do vírus dengue, dentre eles, o descrito por Lanciotti *et al.* (1992). Esses autores desenvolveram a técnica RT-PCR seguida da *nested* PCR para diagnóstico dos sorotipos da dengue. A *nested* PCR consiste na amplificação de uma sequência alvo que está dentro de outra mais abrangente, produzida na primeira reação de amplificação. Desde a extração do RNA até a análise no gel de agarose, o tempo requerido é em média 30 horas.

Para minimizar a contaminação, aumentar rentabilidade, diminuindo o risco de inibição da PCR e degradação do RNA, Harris *et al.* (1998) reduziram os dois passos para uma simples reação, utilizando uma enzima bifuncional termoestável, que faz a transcrição reversa e a amplificação do cDNA ao mesmo tempo. Muitos outros protocolos têm sido desenvolvidos e aprimorados (MORITA *et al.*, 1991; CHOW *et al.*, 1993; SEAH *et al.*, 1995; KUNO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2002; LIOTTA *et al.*, 2005; BRONZONI *et al.*, 2005), esses variam na amplificação genômica (E,NS1, E/NS1, prM/E, NS5, NS5/3'), especificidade e sensibilidade (GUZMÁN & KOURI, 2004).

A técnica de RT-PCR tem demonstrado ser uma boa ferramenta para vigilância virológica de mosquitos adultos e capaz de detectar com antecedência a propagação viral e os sorotipos circulantes. Urdaneta *et al.* (2005) detectaram os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, sendo que o maior número de *pools* de

mosquitos infectados foi encontrado oito semanas antes do aumento do número de casos de dengue em Maracay (Venezuela). Chow *et al.* (1998) detectaram *Aedes aegypti* infectado com vírus do dengue em Cingapura, seis semanas antes do início da epidemia em 1995 e 1996.

No entanto, a maior dificuldade operacional em encontrar o vírus no mosquito é devido à conservação do material. Quando o objetivo é conservar o vírus a temperatura deve ser igual a -70° C. Em condições de temperatura elevada e umidade, o RNA está sujeito à degradação rápida pela atividade de microrganismos (bactérias e fungos sáprofitos). As proteases que envolvem a decomposição da célula também dificultam a detecção do vírus depois de um período relativamente curto (BANGS *et al.*, 2007).

1.2.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR em tempo real)

RT-PCR em tempo real é a reação que inclui um corante fluorescente ou sonda marcada para a detecção do cDNA amplificado à medida que este está sendo produzido. Os produtos da reação são detectados em tempo real, sem a necessidade de realizar a eletroforese, além de quantificar o número de fragmentos de cDNA presentes na amostra e informar em qual ciclo cada amostra ultrapassa o limiar de detecção ajustado (*cycle threshold*). A combinação de excelente sensibilidade e especificidade, baixo risco de contaminação, facilidade de desempenho e velocidade, faz com que este método seja uma alternativa promissora dentre os métodos convencionais utilizados na microbiologia clínica, as quais visam diagnosticar muitas doenças infecciosas (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004; BUSTIN *et al.*, 2005; ESPY *et al.*, 2006).

Algumas desvantagens são apresentadas por esta técnica, tais como, a necessidade de uma plataforma de instrumentação, sondas marcadas com elevado custo e alta habilidade técnica e suporte (WATZINGER *et al.*, 2006).

1.2.4 Ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno

Entre os testes sorológicos para o diagnóstico do dengue, os ensaios imunoenzimáticos são os mais sensíveis, rápidos e com elevada especificidade, sendo amplamente utilizados na detecção do vírus, principalmente em humanos (BARREIRA *et al.*, 2010). Uma das vantagens desse método é a capacidade de detectar o vírus em mosquitos mortos. Thenmozhi *et al.* (2005), detectaram antígenos virais do dengue em mosquitos com temperaturas de armazenamento entre 31°C a 34°C por até quatro semanas. Esta ferramenta pode ser útil para monitoramento do vírus em áreas endêmicas, pois aumenta o número de indivíduos disponíveis para testes no programa de vigilância, sem a necessidade de congelamento.

O genoma viral codifica sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus (ROMANOS, 2008). A proteína NS1 encontra-se em níveis elevados na fase aguda da doença no soro de pacientes com infecções primárias e secundárias, até o nono dia após o início dos sintomas. Atualmente kits para detecção da proteína NS1, são utilizados como métodos alternativos para diagnosticar a infecção em humanos (ALCON *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2010). Contudo, esses kits não permitem a diferenciação entre os sorotipos do vírus dengue.

O antígeno NS1 também está presente em mosquitos e pode ser detectado por meio de ensaios imunoenzimáticos utilizando kits que até então eram usados apenas para diagnóstico em humanos (RAFAEL MACIEL DE FREITAS 2011, comunicação pessoal).

1.3 Vigilância entomológica e vigilância virológica

A vigilância entomológica pode ser entendida como “*a contínua observação e avaliação de informações originadas das características biológicas e ecológicas dos vetores, nos níveis de interação com os hospedeiros humanos e animais reservatórios, sob a influência de fatores ambientais que proporcionem o conhecimento da detecção de qualquer mudança no perfil de transmissão das doenças*” (GOMES, 2002).

No processo de vigilância entomológica dentre as múltiplas variáveis passíveis de obtenção estão, por exemplo, a densidade e a dispersão do vetor, os quais fornecem dados sobre a frequência e disseminação da população no tempo e espaço urbano. Para estimar os índices de infestação do vetor, podemos utilizar vários métodos de coleta ativo ou passivo para obter qualquer um dos estágios de desenvolvimento do vetor. Sendo este um dos principais indicadores para controle do mosquito em campo (GOMES, 1998; DONALÍSIO & GLASSER, 2002)

Por sua vez, podemos aliar a vigilância entomológica à detecção do vírus no vetor, avaliando a presença ativa do vírus no tempo e espaço, bem como os novos sorotipos circulantes em determinada região. As associações desses dados podem contribuir para minimizar os danos à população suscetível ao agente etiológico causador do agravo à saúde, possibilitando o desenvolvimento da construção de base histórica de dados, que permita a identificação dos riscos de situações epidêmicas, funcionando como um sistema de sentinela alerta para reduzir o impacto das epidemias da doença.

1.4 Justificativa

A vigilância virológica em humanos ocorre de forma passiva, ou seja, os sorotipos circulantes são detectados após a instalação da transmissão viral. Nos humanos o vírus só é detectado até o quinto dia do início dos sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), pois rapidamente é neutralizado por anticorpos. Muitos casos podem ser assintomáticos. Estima-se que em uma epidemia de dengue ocorra um caso assintomático para cada cinco casos sintomáticos (SERUFO *et al.*, 2000). Outro problema é a subestimação dos sorotipos circulantes, pois poucos casos chegam ao isolamento viral.

Por exemplo, no município de Foz do Iguaçu no Paraná em 2010 ocorreram 8760 casos confirmados de dengue e apenas 26 casos foram para isolamento viral e confirmação do sorotipo em questão, de acordo com os dados obtidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu, através do SINAN.

No mosquito, o vírus pode utilizar diversos tecidos para a sua multiplicação e manutenção. Após um período de incubação extrínseco, o vetor, torna-se infectante, permanecendo assim pelo resto da vida. Por isso, a detecção do vírus dengue nos vetores apresenta maior viabilidade em comparação a humanos. Nos vetores, a vigilância virológica é pró-ativa podendo detectar com antecedência a propagação viral.

A detecção viral em mosquitos evidencia a posição do vetor como elemento necessário no ciclo de transmissão do vírus dengue durante uma epidemia (LIOTTA *et al.*, 2005). Paralelamente, a identificação dos sorotipos circulantes na população possibilita melhor compreensão do quadro epidemiológico e das manifestações clínicas severas da doença, bem como auxilia no desenvolvimento de estratégias direcionadas para o controle do vetor.

2 OBJETIVO GERAL

Detectar a circulação de mosquitos infectados com o vírus do dengue, utilizando procedimentos de vigilância entomológica.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a infestação de fêmeas de *Aedes aegypti* e de ovos de *Aedes (Stegomyia)* sp. nos diferentes estratos do município de Foz do Iguaçu.
2. Analisar a taxa de incidência de casos confirmados de dengue nos diferentes estratos do município de Foz do Iguaçu.
3. Detectar o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*
4. Avaliar a armadilha Adultrap® como ferramenta para detecção do vírus dengue em populações naturais de vetores.
5. Investigar a transmissão transovariana em populações naturais de *Aedes aegypti*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas no município de Foz do Iguaçu (-25° 32' 52"S e 54° 35' 17"O), localizado no sudoeste do Estado do Paraná. A cidade possui uma 617.702 km² de extensão geográfica e faz fronteira com Paraguai e Argentina, tendo como divisa os rios Paraná e Iguaçu, respectivamente (IBGE, 2011). Foz do Iguaçu faz limite ao norte com o município de Itaipulândia; ao sul com a Argentina; a leste com os municípios de Santa Terezinha de Itaipu, São Miguel do Iguaçu e Medianeira, e a oeste com o Paraguai. A cidade de Foz do Iguaçu é caracterizada pelo turismo, representado principalmente pela Usina Hidrelétrica de Itaipu, Cataratas do Iguaçu e o comércio entre os países vizinhos.

O clima geral é mesotérmico brando superúmido e sem uma estação seca definida. A média pluviométrica anual é de 1650 mm, com período de chuvas entre outubro e janeiro. Nesse período, são alcançadas as temperaturas mais elevadas, podendo atingir 40°C em janeiro. Na estação seca, de maio a agosto, ocorrem as temperaturas mais baixas, variando entre 2°C e 5°C nos dias mais frios. A umidade relativa do ar é elevada e, mesmo no período mais seco, raramente observamos aferições abaixo de 80%. A vegetação é densa e diversificada. Apesar das características gerais de floresta estacional emidecídua, são encontrados extensos fragmentos típicos de savanas, banhados e das matas de araucárias (GUIMARÃES *et al.*, 2003).

3.1.1 Divisão geográfica do município de Foz do Iguaçu

Conforme o método de Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *Aedes aegypti* (LIRAA), Foz do Iguaçu enquadra-se nos municípios de grande porte, com mais de 8100 imóveis, por isso a divisão geográfica do município foi estruturada em estratos. Cada estrato deve ter no mínimo 8100 imóveis e no máximo 12.000, sendo o ideal 9000 imóveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A área de estudo foi dividida em 11 estratos (Figura 1; Tabela I).

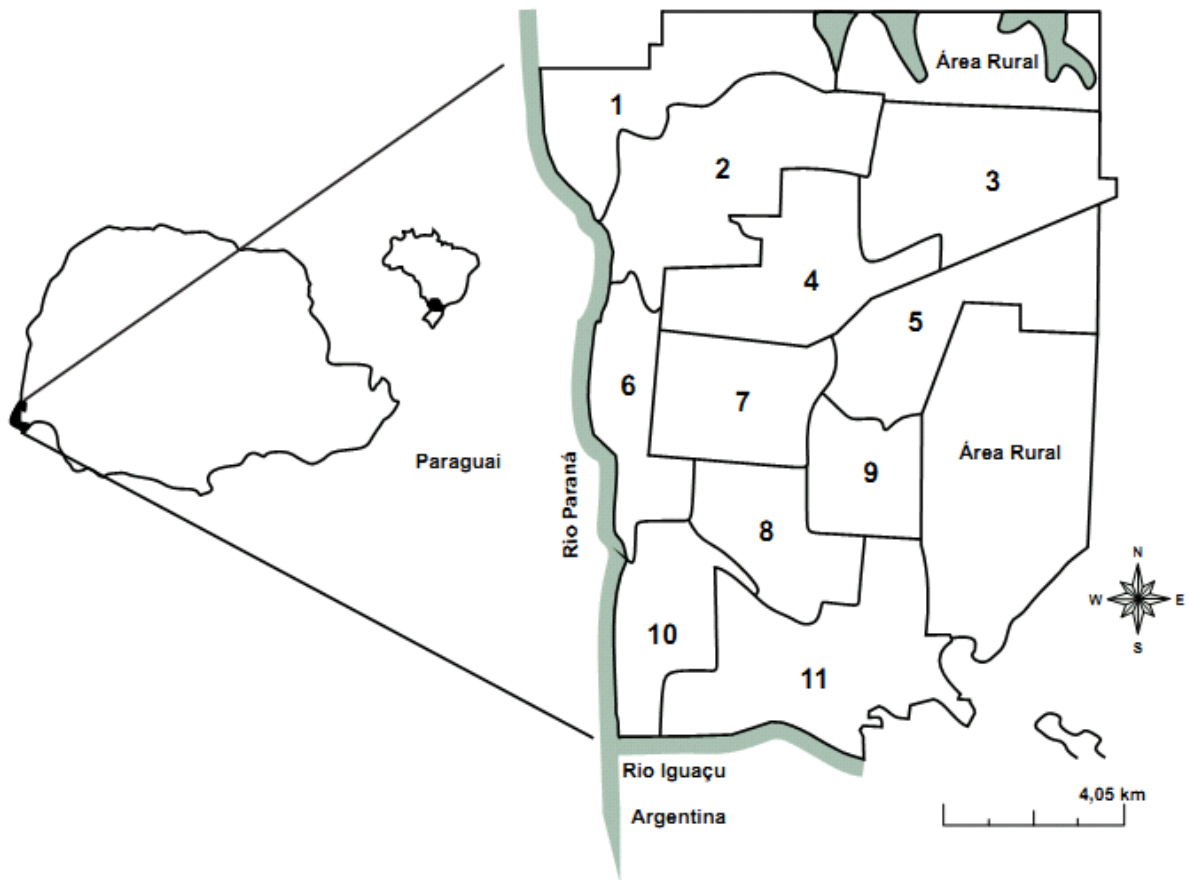


Figura 1. Divisão do município de Foz do Iguaçu localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, região Sul do Brasil, com indicações dos 11 estratos de acordo com LIRAA.

Tabela I. Número de quarteirões, imóveis, e habitantes nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.

	Estratos											Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Número de quarteirões	317	343	292	397	322	273	297	266	297	205	221	3230
Número de imóveis	8530	8386	9129	9312	9397	8166	8714	8307	8438	8551	8100	95030
Número de Habitantes*	25.937	21.259	23.611	27.310	29.358	43.173	24.356	20.538	19.183	25.880	20.348	280.953

*Fonte: Censo demográfico/ IBGE 2000.

3.2 Procedimentos de coleta e laboratório

3.2.1 Armadilha Adultrap®

3.2.1.1 Captura de mosquitos em períodos interepidêmicos e de transmissão

As sete coletas foram realizadas pela equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ) utilizando armadilha Adultrap® (Tabela II, Figura 2) com água de torneira como atrativo, descrita por Donatti e Gomes (2007).

Tabela II. Coletas realizadas com a armadilha Adultrap® por data, estação do ano e semana epidemiológica, no município de Foz do Iguaçu, Paraná.

Data da coleta	Estação do ano	Semana Epidemiológica
9 a 11 de dezembro de 2008	primavera	50
9 a 13 de fevereiro de 2009	verão	6
18 a 26 de maio de 2009	outono	20 e 21
19 a 23 de outubro de 2009	primavera	42
9 a 18 de março de 2010	verão	10 e 11
11 a 19 de maio de 2010	outono	19 e 20
13 a 23 de setembro de 2010	inverno	38



FIGURA 2. Armadilha Adultrap® utilizada para captura de culicídeos no município de Foz do Iguaçu, Paraná. “A armadilha apresenta forma cilíndrica e na extremidade superior é côncava, contendo um espaço para passagem do mosquito. A inferior é convexa. Lateralmente, é revestida por uma tela fina, a qual está ligada a um recipiente para colocar água ou outra isca atrativa. Internamente, existem dois compartimentos separados por um material transparente em formato de cones contendo um orifício de tamanho suficiente para passagem do mosquito adulto. O recipiente para a isca é separado das partes internas da armadilha por uma tela, sem qualquer chance de contato direto do mosquito com a isca usada” (GOMES et al., 2007).

Para instalação das armadilhas foi adotada a amostragem de acordo com o Ministério da Saúde (2005). Foram instaladas 450 armadilhas por estratos, totalizando 4.950 Adultrap® por coleta, de acordo com o procedimento já realizado na rotina do Centro de Controle de Zoonoses. Na captura de maio/2010 não foram realizadas capturas nos estratos de 7 a 11, devido às condições meteorológicas.

As armadilhas eram instaladas no peridomicílio e permaneciam 24 horas no campo. Todas as armadilhas Adultrap® eram abertas para inspeção e captura dos mosquitos. A armadilha era introduzida em saco plástico transparente e aberta, os insetos eram retirados com o auxílio do capturador manual de Castro e colocados nos tubitos, com as devidas identificações. Os mosquitos que foram retirados mortos da armadilha também eram guardados e identificados, uma vez que sabidamente estavam mortos por no máximo 24 horas. Os tubitos com mosquitos eram acondicionados no botijão de nitrogênio líquido e armazenados até o fim da coleta para serem transportados ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná, onde ficavam em freezer -70° C.

No laboratório os adultos da Adultrap® foram triados em mesa refrigerada a -20°C com microscópio estereoscópio, para detecção do vírus dengue por RT-PCR. Nesta triagem os mosquitos eram separados por espécie (*Aedes aegypti*, *Aedes*

albopictus e outros Culicidae), sexo (macho e fêmea), estrato (1 a 11) e data da coleta. Após, eram formados os *pools*, em tubo de 1,5 ml onde eram colocados de 1 a 10 mosquitos no máximo, de acordo com a espécie, sexo, estrato e data da coleta. As outras espécies de Culicidae capturadas não foram incluídas na análise de detecção viral.

3.2.1.2 Captura de mosquitos em residências de moradores com suspeita de dengue

As armadilhas Adultrap® foram instaladas no período de novembro de 2010 a maio de 2011, pelo Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu. A partir do momento que uma pessoa é notificada para dengue na unidade de saúde, eram instaladas 50 armadilhas Adultrap®, sendo o ponto de partida dessa instalação o imóvel onde reside a pessoa notificada, o raio de instalação foi em torno de 150 a 200 m. Foi instalada uma armadilha no peridomicílio de cada residência. A logística de instalação de armadilhas é a mesma utilizado no LIRAA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A leitura da armadilha foi realizada em 24 horas e somente foram armazenadas as fêmeas que estavam vivas no momento do congelamento. Os mosquitos eram congelados e armazenados em freezer -20°C. Os mosquitos provenientes dessas residências foram avaliados através da técnica de RT-PCR e pela técnica de captura do antígeno NS1, realizada pelo Laboratório de Transmissores de Hematozoários (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz/RJ).

3.2.2 Captura de mosquitos para detecção da transmissão transovariana

As coletas foram realizadas pela equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ). Foram realizadas sete coletas (Tabela III) com a armadilha ovitrampa, originalmente descrita por Fay e Eliason (1966). Consiste em um vaso preto de plástico com capacidade para 500 ml de água de torneira e uma paleta de Eucatex medindo 2 cm de largura por 12 cm de comprimento, presa com um clipe no vaso (Figura 3).

Tabela III. Coletas realizadas com a armadilha ovitrampa por data, estação do ano e semana epidemiológica, no município de Foz do Iguaçu, Paraná.

Data da coleta	Estação do ano	Semana Epidemiológica
8 a 12 de dezembro de 2008	Primavera	50
13 a 17 de fevereiro de 2009	Verão	6 e 7
22 a 26 de maio de 2009	Outono	20 e 21
23 a 27 de outubro de 2009	Primavera	42 e 43
14 a 18 de março de 2010	Verão	11
10 a 14 de maio de 2010	Outono	19
20 a 24 de outubro de 2010	Primavera	42 e 43



Figura 3. Armadilha ovitrampa composta por um vaso preto de 500 ml, uma paleta de eucatex presa com um clipe ao suporte de plástico preto. Foto cedida por Rosinei Kafka (CCZ-Foz do Iguaçu).

Foram instaladas 15 armadilhas por estrato, totalizando 165 armadilhas. Essas eram instaladas aleatoriamente dentro dos estratos e permaneciam no campo durante cinco dias, eram instaladas na segunda-feira e retiradas na sexta-feira. As paletas eram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e guardadas em caixas de papelão para serem enviadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da UFPR.

3.2.2.1 Criação dos mosquitos coletados com as armadilhas ovitrampas para detecção da transmissão transovariana

Em laboratório os ovos eram quantificados sob microscópio estereoscópico. Todo processo de criação foi realizado em condições similares de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($80\pm 10\%$) e fotoperíodo (12h: 12h), ideais para a espécie no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária do Departamento de Zoologia da UFPR. Para induzir a eclosão, as paletas com ovos eram submersas em copos plásticos de 770 ml contendo água desclorada e ração de gatos triturada (Purina® Cat Chow ®), por 48 horas. Após, eram retiradas as larvas e descartada a água. As paletas eram novamente submersas em água por mais 48 horas com alimento, para maximizar a eclosão das larvas. Estas eram mantidas nos copos com tampa com alimento até a emergência do adulto. Os adultos eram separados por estratos e triados em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, machos e fêmeas.

Para detecção da transmissão transovariana por RT-PCR, uma amostragem dos mosquitos foram acondicionados em tubo de 1,5 ml previamente identificado e armazenados em freezer -70°C . Os *pools* foram formados de 1 a 15 mosquitos no máximo, de acordo com o estrato, sexo e data da coleta.

3.2.3 Extração do RNA viral

Para extração do RNA cada *pool* foi macerado utilizando homogeneizador em 350 μL de meio de cultura L-15 Leibovitz's (Gibco, BRL), e centrifugado por 30 minutos a 6.000 rpm e 0°C . Do sobrenadante do macerado de mosquitos foi extraído o RNA utilizando o kit QIAamp® Viral Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA), segundo protocolo do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop®. Os RNAs eluídos foram mantidos em freezer -70°C até serem utilizados.

3.2.4 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Os iniciadores (IDT, Coralville, IA, USA) utilizados seguiram Lanciotti *et al.* (1992) (Tabela II). O RT-PCR foi de acordo com Singh *et al.* (2008) modificado e Lanciotti *et al.* (1992). Para obtenção do cDNA, 2000 ng do RNA viral e 50 pmoles do iniciador D2, foram colocados no termociclador por 5 minutos a 70°C. Após este período, a amostra foi mantida em gelo e adicionado 5 µL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2,5 mM espermidina e 50 mM DTT), dNTP 200 µM (Amresco, Solon, OH), 20 U de AMV transcriptase reversa (Promega Madison, WI) completando com água ultrapura tratada com DEPC 0,1%, para 25 µL. A amostra foi mantida em termociclador por 90 min a 42°C e 15 min a 70°C.

Para a reação de amplificação, foram colocados 3 µL de cDNA, 2,5 µL do tampão 10X (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM de DTT, 0,5% de Tween®, 20,50% de glicerol), 20 pmoles do iniciador D1, 20 pmoles do iniciador D2, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM (Amresco, Solon, OH), 3 U de Amplitaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), completando com água ultrapura tratada com DEPC 0,1% para 25 µL. A reação foi submetida a 35 ciclos térmicos utilizando os seguintes parâmetros 94°C por 30s, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min.

Para a reação de *nested* PCR, foram colocados uma alíquota de 3 µL da primeira reação de amplificação, 2,5 µL do tampão 10X, 20 pmoles dos iniciadores D1, TS1, TS2, TS3, TS4, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM (Amresco, Solon, OH), 3 U de Amplitaq Gold DNA polimerase (Perkin Elmer Applied Biosystems), completando com água ultrapura tratada com DEPC 0,1% para 25 µL. A reação foi realizada seguindo os seguintes parâmetros 20 ciclos térmicos de 94°C por 30s, 55°C por 1min e 72°C por 2

O resultado da amplificação foi avaliado através de eletroforese de uma alíquota de 6 µL em gel de poliacrilamida 9% em TBE1X (Tris-HCl 90 mM pH 8,0; EDTA 2,5 mM pH 8,0; ácido bórico 90 mM).

Como controle negativo foi adicionado água no lugar de RNA. Para o controle positivo de todas as etapas, foi utilizado RNA do sobrenadante de cultura de células de *Aedes albopictus* (C6/36) positivas para técnica de imunofluorescência indireta, cedidas pelo Laboratório Central do Paraná (LACEN).

Tabela IV. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do vírus do dengue e dos seus respectivos sorotipos, de acordo com Lanciotti *et al.* (1992).

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplificado (pb)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	482
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	119
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	290
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	392

3.2.5 Confirmação da técnica de extração e RT-PCR em mosquitos experimentalmente infectados

Os mosquitos experimentalmente infectados foram cedidos pelo Dr. Rafael Maciel de Freitas do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz/RJ). Foram utilizados dois mosquitos inoculados intratoracicamente com DENV-2, um com título viral de 10^{10} e 10^5 (Figura 4).

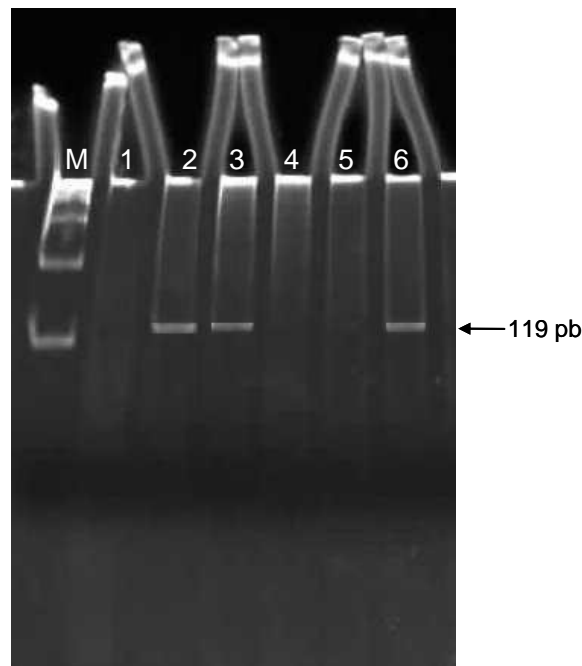


Figura 4: Amplificados obtidos pela reação de RT-PCR. M: Marcador molecular de 100-bp (Amresco, Sólón, Ohio).; 1: controle negativo; 2: 1 mosquito com título viral 10^{10} infectado com DENV-2; 3: 1 mosquito com título viral 10^5 infectado com DENV-2; 4 e 5 produtos não amplificados; 6: controle positivo de cultura de células C6/36 infectadas com DENV-2.

3.2.6 Detecção do vírus dengue através da técnica de captura do antígeno NS1

Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Transmissores de Hematozoários (Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz / RJ), coordenado pelo Dr. Rafael Maciel de Freitas. Foi utilizado o kit Platelia Dengue NS1 Ag assay (Bio-Rad), segundo instruções do fabricante.

3.3 Levantamento dos dados epidemiológicos

O presente estudo avaliou a ocorrência dos casos da dengue no município de Foz do Iguaçu entre 2008 a 2011. Foram utilizados dados referentes ao número de casos confirmados que possuíam endereço na área urbana de Foz do Iguaçu. Os dados foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de Foz do Iguaçu, por meio do Sistema de Informação de Agravos e Notificações (SINAN).

3.4 Análises dos dados

Para estimar a taxa mínima de infecção viral em *Aedes aegypti* foi calculada razão entre o número de *pools* infectados pelo número total de mosquitos, multiplicado por 1000 (CHOW *et al.*, 1998).

Na análise das ovitrampas foi calculado o índice de positividade de ovitrampas (IPO), expresso pela razão entre o número de armadilhas positivas e o número de armadilhas examinadas, multiplicado por 100. E o índice de densidade de ovos (IDO) que é a razão do número de ovos pelo número de armadilhas positivas (GOMES, 1998).

4 RESULTADOS

4.1 Dados bioecológicos

4.1.1 Adultrap®

Foram capturados 2558 mosquitos com armadilha de adultos, sendo 2418 *Aedes aegypti* (2395 fêmeas e 23 machos), 14 fêmeas *Aedes albopictus* e 126 de outros culicídeos (71 fêmeas e 55 machos). O número de fêmeas de *A. aegypti* capturadas em Foz do Iguaçu com Adultrap® variou de 0,11 a 13,25 a cada 1000 imóveis (Tabela V), e de 0,04 a 5,47 a cada 1000 habitantes (Tabela VI).

Tabela V. Fêmeas de *Aedes aegypti* a cada 1000 imóveis, coletadas de dezembro de 2008 a setembro de 2010 com Adultrap® nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.

Estratos	dez/08 (50)	fev/09 (6)	mai/09 (20 e 21)	out/09 (42)	mar/10 (10 e 11)	mai/10 (19 e 20)	set/10 (38)
1	0,35	4,10	5,16	3,63	13,25	3,63	0,23
2	1,19	5,37	10,85	3,22	9,18	1,07	0,95
3	0,33	4,82	9,75	1,75	5,59	1,97	1,20
4	0,97	5,69	7,95	0,86	6,87	1,72	0,97
5	1,17	8,09	6,49	1,38	4,58	1,70	0,43
6	0,73	5,76	4,78	1,47	7,35	3,18	1,59
7	1,03	4,48	5,16	3,56	9,07	X	0,11
8	0,12	2,41	6,14	0,72	6,14	X	0,72
9	0,36	8,65	0,71	1,30	12,44	X	0,71
10	1,17	7,48	1,99	0,58	12,51	X	1,05
11	0,37	6,67	1,11	3,21	7,53	X	0,86

*X: coletas não realizadas

**Número de mosquitos capturados nos estratos/ Número de imóveis nos estratos x 1000

***(): semana epidemiológica

Tabela VI. Fêmeas de *Aedes aegypti* a cada 1000 habitantes, coletadas de dezembro de 2008 a setembro de 2010 com Adultrap® nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.

Estratos	dez/08 (50)	fev/09 (6)	mai/09 (20 e 21)	out/09 (42)	mar/10 (10 e 11)	mai/10 (19 e 20)	set/10 (38)
1	0,12	1,35	1,70	1,20	4,36	1,20	0,08
2	0,47	2,12	4,28	1,27	3,62	0,42	0,38
3	0,13	1,86	3,77	0,68	2,16	0,76	0,47
4	0,33	1,94	2,71	0,29	2,34	0,59	0,33
5	0,37	2,59	2,08	0,44	1,46	0,54	0,14
6	0,14	1,09	0,90	0,28	1,39	0,60	0,30
7	0,37	1,60	1,85	1,27	3,24	X	0,04
8	0,05	0,97	2,48	0,29	2,48	X	0,29
9	0,16	3,81	0,31	0,57	5,47	X	0,31
10	0,39	2,47	0,66	0,19	4,13	X	0,35
11	0,15	2,65	0,44	1,28	3,00	X	0,34

*X: coletas não realizadas

**Número de mosquitos capturados nos estratos/ Número de habitantes nos estratos x 1000

***(): semana epidemiológica

4.1.2 Ovitampa

Foram coletados um total de 11.663 ovos nas ovitampas, destes 30,9% (3603) não emergiram, 69,1% desenvolveram até adulto (Tabela VII), destes 67,14% (7830) eram *Aedes aegypti* (Tabela VIII) e 1,97% (230) *Aedes albopictus* (Tabela IX). A positividade das armadilhas ovitampas variou de 0 a 93% (Tabela X). O número médio de ovos por armadilha variou de 0 a 106 ovos (Tabela XI).

Tabela VII. Porcentagem de emergência (%), média e desvio padrão dos ovos coletados com ovitrampas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, de dezembro de 2008 a outubro de 2010.

Estratos	dez/08 (50)	fev/09 (6 e 7)	mai/09 (20 e 21)	out/09 (42 e 43)	mar/10 (11)	mai/10 (19)	out/10 (42 e 43)
1	76,0	79,2	65,6	3,8	54,7	17,8	63,0
2	88,3	82,6	56,8	76,6	84,8	x	18,6
3	x	70,9	58,6	32,8	50,0	100,0	93,3
4	73,2	70,8	75,7	61,3	64,3	0,0	0,0
5	63,7	69,6	43,2	40,6	82,4	0,0	68,1
6	74,4	82,9	76,9	61,3	87,3	4,9	14,6
7	85,6	73,4	63,2	41,7	78,3	0,0	71,4
8	13,7	75,7	81,8	70,8	76,5	28,6	75,0
9	88,0	84,7	34,0	68,3	73,3	x	x
10	78,0	90,8	75,0	87,0	72,3	x	x
11	52,5	88,6	60,3	0,0	81,2	x	0,0
Média e desvio padrão	69,3±21,3	79,0±7,1	62,8±14,0	49,5±27,3	73,2±11,6	21,6±33,6	44,9±34,1

*(): semana epidemiológica

**x: Não foram coletados ovos

Tabela VIII. Número de machos e fêmeas de *Aedes aegypti* emergidos dos ovos provenientes das ovitrampas instaladas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu entre dezembro de 2008 a outubro de 2010.

E	dez/08 (50)		fev/09 (6 e 7)		mai/09 (20 e 21)		out/09 (42 e 43)		mar/10 (11)		mai/10 (19)		out/10 (42 e 43)		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1	13	6	49	50	109	71	1	0	138	120	17	6	7	10	334	263
2	36	17	105	113	113	122	53	58	53	64	x	x	7	6	367	380
3	x	x	53	64	91	103	12	7	2	2	1	0	9	5	168	181
4	13	17	153	127	151	177	53	96	87	77	0	0	0	0	457	494
5	34	28	124	128	55	58	47	39	62	50	0	0	32	30	354	333
6	14	15	277	275	67	50	10	9	132	143	0	2	2	4	502	498
7	42	35	182	141	83	82	2	3	37	46	0	0	22	23	368	330
8	5	2	190	183	60	70	9	8	69	61	0	6	3	3	336	333
9	39	42	255	217	18	17	86	91	37	26	x	x	x	x	435	393
10	19	13	123	115	29	31	105	103	153	155	x	x	x	x	429	417
11	17	15	110	76	33	52	0	0	93	62	x	x	0	0	253	205
Total	232	190	1621	1489	809	833	378	414	863	806	18	14	82	81	4003	3827

*E: estratos

**() semana epidemiológica

***x: Não foram coletados ovos

Tabela IX. Número de machos e fêmeas de *Aedes albopictus* emergidos dos ovos provenientes das ovitrampas instaladas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu entre dezembro de 2008 a outubro de 2010.

E	dez/08 (50)		fev/09 (6 e 7)		mai/09 (20 e 21)		out/09 (42 e 43)		mar/10 (11)		mai/10 (19)		out/10 (42 e 43)		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1	0	0	0	0	0	1	0	0	6	4	0	0	0	0	6	5
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	x	x	0	0	0	0
3	x	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	2	1	17	35	0	0	0	0	0	0	0	0	19	36
5	3	7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7
6	0	0	0	0	7	9	0	0	54	41	0	0	0	0	61	50
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	x	x	x	x	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	24	18	x	x	x	x	24	18
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	x	x	0	0	0	0
Total	3	7	2	1	25	45	0	0	84	63	0	0	0	0	114	116

*E: estratos

**() semana epidemiológica

***x: Não foram coletados ovos

Tabela X. Índice de positividade das ovitrampas (IPO) distribuídas por estrato e data de coleta (semana epidemiológica) no município de Foz do Iguaçu.

Estratos	dez/08	fev/09	mai/09	out/09	mar/10	mai/10	out/10
	(50)	(6 e 7)	(20 e 21)	(42 e 43)	(11)	(19)	(42 e 43)
1	27	33	80	20	80	40	13
2	40	33	67	60	60	0	7
3	0	53	60	20	13	7	7
4	7	93	73	53	53	13	13
5	40	60	40	53	20	13	20
6	20	93	47	33	27	20	13
7	20	80	47	13	33	7	20
8	13	80	73	20	40	13	7
9	47	87	33	40	27	0	0
10	20	53	33	40	73	0	0
11	53	80	47	13	40	0	7

*() semana epidemiológica

Tabela XI. Índice de densidade de ovos (IDO) por estrato e data de coleta (semana epidemiológica) no município de Foz do Iguaçu.

Estratos	dez/08	fev/09	mai/09	out/09	mar/10	mai/10	out/10
	(50)	(6 e 7)	(20 e 21)	(42 e 43)	(11)	(19)	(42 e 43)
1	6	25	23	9	41	22	14
2	10	53	41	16	15	0	70
3	0	21	37	19	4	1	15
4	41	29	46	30	32	6	10
5	19	40	44	27	45	7	30
6	13	48	25	6	106	14	21
7	30	37	37	6	21	9	21
8	26	41	14	8	28	11	8
9	13	43	21	43	22	0	0
10	14	33	16	40	44	0	0
11	8	18	20	36	32	0	33

*()semana epidemiológica

4.2 Dados epidemiológicos

Entre 2008 a 2011 foram registrados 11.466 casos confirmados de dengue na área urbana do município de Foz do Iguaçu, sendo que 2010 foi o ano com maior incidência de casos da doença em todos os estratos do município (Tabela XII). Das semanas epidemiológicas onde foram realizadas as coletas as que tiveram elevada incidência de dengue foram as semanas: 10, 11, 19 e 20 (2010) e 11 (2011) (Tabela XIII). Em 2008 e 2009 a maior incidência de dengue ocorreu na semana epidemiológica 15, em 2010 os picos foram nas semanas 15 e 17 e em 2011 nas semanas 11 e 12. (Figuras 5 e 6).

Em 2010 e 2011 o sorotipo da dengue predominante em humanos no município de Foz do Iguaçu foi o DENV-1. O DENV-3 foi registrado em 2008 com um caso apenas. No ano de 2009 não ocorreu isolamento viral em humanos (Tabela XIV).

Tabela XII. Número de casos de dengue confirmados e incidência da doença por 100.000 habitantes nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná de 2008 a 2011.

Estratos	2008		2009		2010		2011	
	Casos	Incidência	Casos	Incidência	Casos	Incidência	Casos	Incidência
1	6	23,1	8	30,8	584	2251,6	246	948,5
2	5	23,5	6	28,2	777	3654,9	222	1044,3
3	18	76,2	6	25,4	898	3803,3	322	1363,8
4	2	7,3	6	22,0	533	1951,7	258	944,7
5	4	13,6	8	27,2	1437	4894,7	202	688,1
6	6	13,9	10	23,2	757	1753,4	248	574,4
7	0	0,0	6	24,6	377	1547,9	248	1018,2
8	10	48,7	4	19,5	1006	4898,2	266	1295,2
9	6	31,3	1	5,2	501	2611,7	372	1939,2
10	6	23,2	5	19,3	893	3450,5	214	826,9
11	5	24,6	2	9,8	818	4020,1	157	771,6

*Fonte: CCZ de Foz de Iguaçu/ Sistema de Informação de Agravos e Notificações (SINAN).

**Incidência: Número de casos de dengue confirmados nos estratos/ Número de habitantes nos estratos x 100.000

Tabela XIII. Incidência de dengue por 100.000 habitantes nas semanas epidemilógicas onde foram realizadas as coletas nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná de 2008 a 2011.

E	2008			2009				2010				2011						
	50	6	7	20	21	42	43	10	11	19	20	38	42	43	1	2	5	11
1	0,0	0,0	0,0	7,7	0,0	0,0	0,0	188,9	181,2	104,1	46,3	0,0	0,0	0,0	3,9	0,0	3,9	123,4
2	4,7	9,4	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0	334,0	221,1	122,3	51,7	0,0	0,0	0,0	4,7	0,0	42,3	122,3
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	148,2	190,6	279,5	122,8	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	8,5	199,1
4	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0	62,2	73,2	142,8	84,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	234,3
5	0,0	0,0	0,0	3,4	3,4	0,0	0,0	231,6	371,3	521,2	177,1	0,0	0,0	0,0	0,0	6,8	10,2	163,5
6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	53,3	85,7	150,6	69,5	0,0	0,0	0,0	2,3	4,6	13,9	106,5
7	0,0	0,0	0,0	4,1	0,0	0,0	0,0	49,3	78,0	151,9	90,3	0,0	0,0	0,0	4,1	8,2	16,4	271,0
8	0,0	14,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	238,6	316,5	306,7	209,4	0,0	0,0	0,0	14,6	14,6	14,6	219,1
9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	151,2	172,0	192,9	52,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,4	578,6
10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	150,7	255,0	193,2	100,5	0,0	0,0	0,0	3,9	0,0	38,6	135,2
11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	167,1	294,9	339,1	157,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,9	157,3

*E: estratos

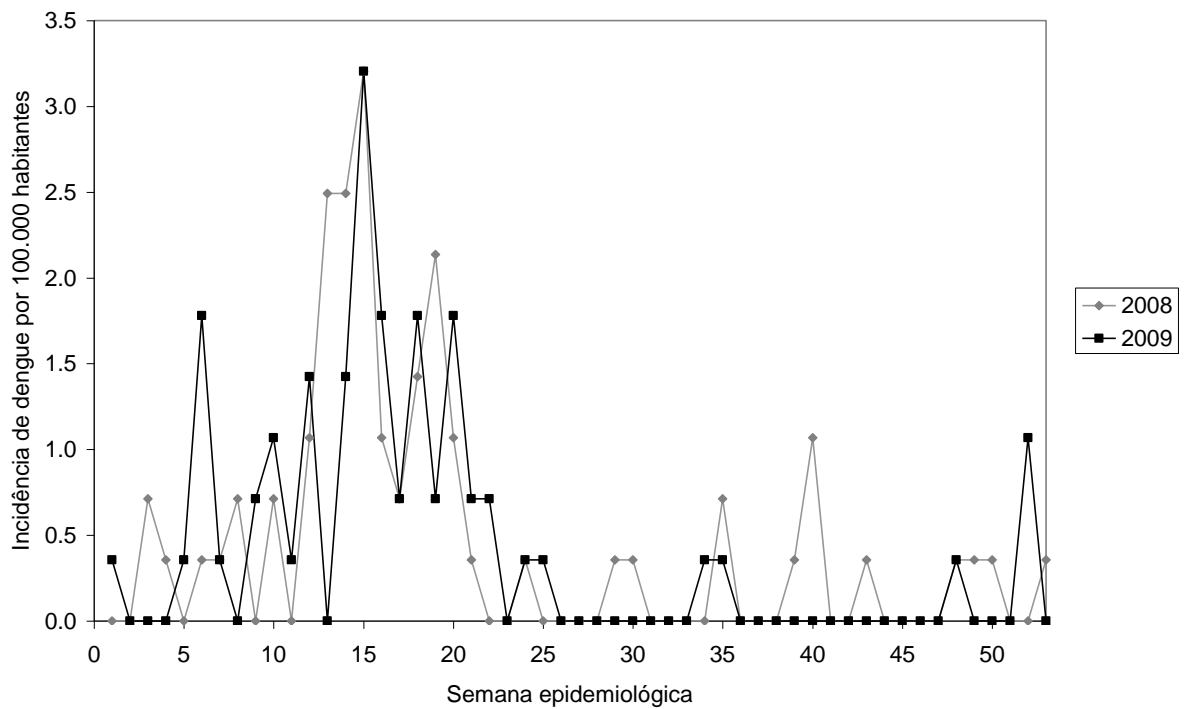


Figura 5. Incidência de dengue por 100.000 habitantes durante as semanas epidemiológicas de 2008 e 2009 no município de Foz do Iguaçu, de acordo com dados do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu/SINAN.

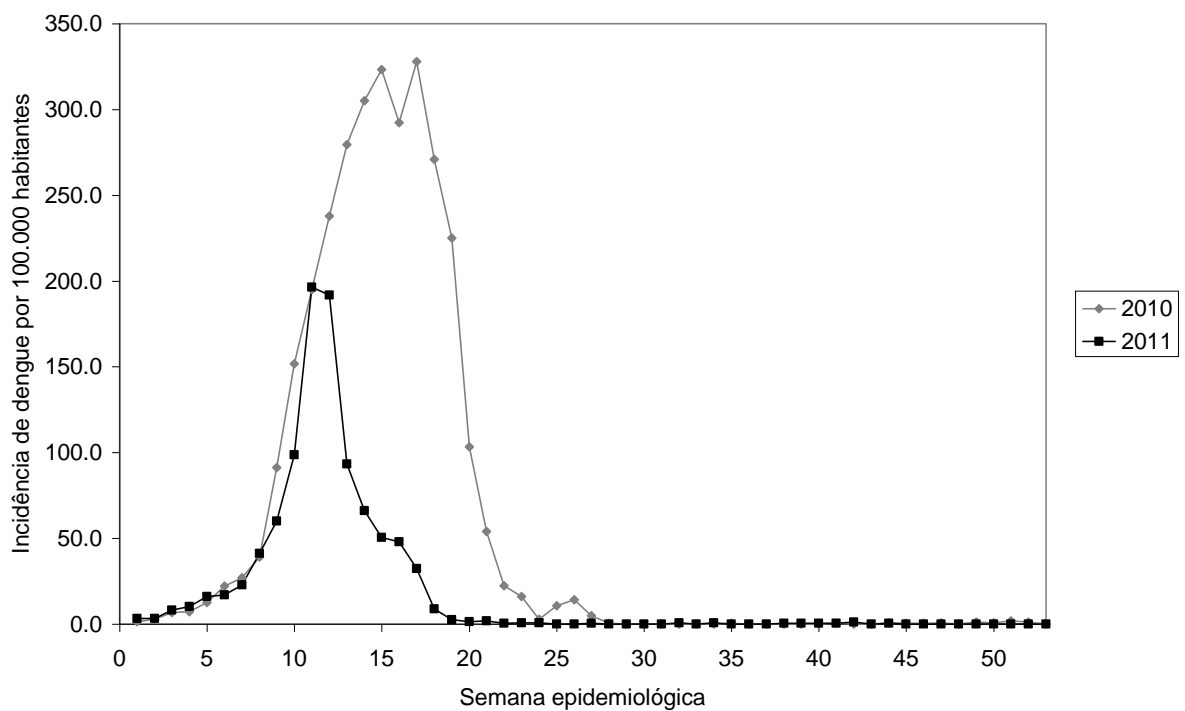


Figura 6. Incidência de dengue por 100.000 habitantes durante as semanas epidemiológicas de 2010 e 2011 no município de Foz do Iguaçu, de acordo com dados do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu/SINAN.

Tabela XIV. Sorotipos do vírus dengue isolados de casos humanos de 2008 a 2011, nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.

Estratos	2008		2010		2011**	
	DEN-3	DEN-1	DEN-2	DEN-1	DEN-2	
1	0	0	0	11	3	
2	0	2	0	2	0	
3	0	0	0	7	2	
4	0	1	0	10	3	
5	1	5	0	4	0	
6	0	1	0	7	1	
7	0	1	0	2	1	
8	0	4	0	2	0	
9	0	3	0	3	0	
10	0	6	0	2	0	
11	0	2	1	2	0	
Total	1	25	1	52	10	

*Fonte: CCZ de Foz de Iguaçu/ Divisão de Vigilância epidemiológica de Foz do Iguaçu.

**Dados até Junho de 2011

4.3 Detecção do vírus dengue

4.3.1 Adultrap®

4.3.1.1 Captura de mosquitos em períodos interepidêmicos e de transmissão

Foram analisados 2432 culicídeos capturados (330 *pools* de mosquitos), sendo que 99,4% (2418) eram *Aedes aegypti* e 0,6% (14) *Aedes albopictus*. Dos *A. aegypti* coletados 78% (1887) dos indivíduos estavam vivos quando foram retirados da armadilha para serem congelados no nitrogênio líquido e 22% (531) estavam mortos.

Foram detectados cinco *pools* positivos para o vírus do dengue em fêmeas que foram congeladas vivas (Tabela XV). Destes, quatro *pools* eram positivos para DENV-2 e um *pool* positivo para DENV-1 e DENV-2 (Tabela XVI; Figura 7). A taxa

mínima de infecção (TMI) para fêmeas de *Aedes aegypti* foi de 2,7 mosquitos infectados por 1000 mosquitos analisados. Quando observamos a porcentagem de mosquitos infectados por estrato e coleta, o número de *pools* positivos oscila entre 12,5 a 60% (Tabela XVII). Nenhum *pool* de fêmeas, que já estavam mortas na armadilha e foram acondicionados no nitrogênio líquido, foi encontrado positivo para o vírus dengue (Tabela XV). Não foram detectados machos de *A. aegypti* infectados através da transmissão transovariana (Tabela XVIII) e nenhum espécime de *Aedes albopictus* infectado (Tabela XIX).

Tabela XV. Número de fêmeas congeladas vivas e mortas, *pools* processados e *pools* positivos de *Aedes aegypti*, coletados com armadilha Adultrap® e avaliados pela técnica de RT-PCR, no município de Foz do Iguaçu, Paraná.

Mosquitos	Fêmeas	<i>A. aegypti</i>
	Nº mosquitos	1871
Vivos	<i>Pools</i> processados	221
	<i>Pools</i> positivos	5
	Nº mosquitos	524
Mortos	<i>Pools</i> processados	83
	<i>Pools</i> positivos	0

Tabela XVI. *Pools* positivos de *Aedes aegypti* coletados com a armadilha Adultrap® no município de Foz do Iguaçu e avaliados pela técnica RT-PCR, de acordo com o sorotipo, número de fêmeas, estrato, data e semana epidemiológica.

Sorotipos	Número de fêmeas por <i>pool</i>	Estrato	Coleta	Semana epidemiológica
DENV-2	10	2	9 a 13/02/2009	6
DENV-2	10	2	9 a 13/02/2009	6
DENV-2	1	2	9 a 13/02/2009	6
DENV-1 e 2	10	5	9 a 13/02/2009	6
DENV-2	10	2	18 a 26/05/2009	20 e 21

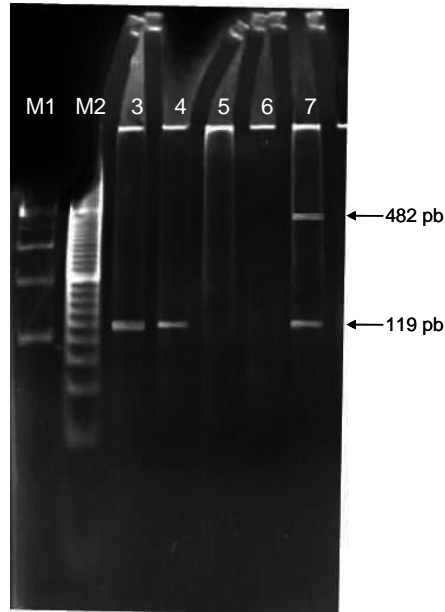


Figura 7: Amplificados obtidos pela reação de RT-PCR. M1: Marcado molecular de 100-bp (Amresco, Sólón, Ohio); M2: Marcador molecular de 25-bp (Promega, Madison, WI); 3: *Pool* de dez fêmeas de *Aedes aegypti* infectado com DENV-2 no estrato 2; 4: *Pool* de dez fêmeas de *Aedes aegypti* infectado com DENV-2 no estrato 2; 5 e 6: Amostras não amplificadas; 7: *Pool* de dez fêmeas de *Aedes aegypti* infectados com DENV-1 e DENV-2 no estrato 5.

Tabela XVII. *Pools* formados (PF) e *pools* positivos (PP) (%) para o vírus do dengue, de fêmeas congeladas vivas de *Aedes aegypti*, coletadas com armadilha Adultrap® nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu e avaliadas pela técnica RT-PCR.

Estrato	Dezembr o 2008		Fevereiro 2009		Maio 2009		Outubro 2009		Março 2010		Maio 2010		Setembro 2010		Total	
	PF	PP	PF	PP	PF	PP	PF	PP	PF	PP	PF	PP	PF	PP	PF	PP
1	1	0	3	0	4	0	3	0	10	0	3	0	0	0	24	0
2	2	0	5	3 (60,0)	6	1 (16,7)	2	0	6	0	1	0	1	0	23	4 (17,4)
3	1	0	6	0	7	0	1	0	4	0	2	0	1	0	22	0
4	2	0	5	0	7	0	1	0	6	0	2	0	1	0	24	0
5	2	0	8	1 (12,5)	5	0	1	0	4	0	1	0	1	0	22	1 (4,5)
6	1	0	4	0	4	0	1	0	3	0	3	0	2	0	18	0
7	1	0	4	0	4	0	3	0	7	0	0	0	1	0	20	0
8	1	0	3	0	4	0	1	0	5	0	0	0	1	0	15	0
9	1	0	4	0	1	0	1	0	10	0	0	0	1	0	18	0
10	1	0	7	0	2	0	1	0	10	0	0	0	1	0	22	0
11	1	0	4	0	2	0	2	0	3	0	0	0	1	0	13	0
Total	14	0	53	4(7,55)	46	1(2,17)	17	0	68	0	12	0	11	0	221	5(2,26)

Tabela XVIII. Número de mosquitos machos congelados vivos ou mortos, *pools* processados e *pools* positivos de *Aedes aegypti*, coletados com armadilha Adultrap® no município de Foz do Iguaçu e avaliados pela técnica de RT-PCR.

Mosquitos	Machos	<i>A. aegypti</i>
	Nº mosquitos ♂	16
Vivos	<i>Pools</i> processados	13
	<i>Pools</i> positivos	0
	Nº mosquitos ♂	7
Mortos	<i>Pools</i> processados	5
	<i>Pools</i> positivos	0

Tabela XIX. Número de fêmeas congeladas vivas e mortas, *pools* processados e *pools* positivos de *Aedes albopictus*, coletados com armadilha Adultrap® no município de Foz do Iguaçu e avaliados pela técnica de RT-PCR.

Mosquitos	Fêmeas	<i>A. albopictus</i>
	Nº mosquitos	4
Vivos	<i>Pools</i> processados	4
	<i>Pools</i> positivos	0
	Nº mosquitos	10
Mortos	<i>Pools</i> processados	4
	<i>Pools</i> positivos	0

4.3.1.2 Captura de mosquitos direcionada para residências de moradores com suspeita de dengue

Foram coletadas 223 fêmeas de *Aedes aegypti* de novembro de 2010 a maio de 2011, distribuídas em 31 *pools*. Não foi encontrado nenhum *pool* infectado pela técnica de RT-PCR. Utilizando detecção do antígeno NS1 foram encontrados sete *pools* infectados com o vírus dengue (Tabelas XX e XXI).

Tabela XX. *Pools* processados, número de *Aedes aegypti* e *pools* positivos para técnica de RT-PCR e detecção do antígeno NS1, nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná,

Estratos	<i>Pools</i> processados	Número de <i>A. aegypti</i>	<i>Pools</i> positivos	
			RT-PCR	NS1
1	0	0	0	0
2	3	18	0	1
3	3	29	0	0
4	1	2	0	0
5	3	23	0	1
6	3	25	0	1
7	5	37	0	1
8	5	35	0	3
9	6	45	0	0
10	2	9	0	0
11	0	0	0	0

Tabela XXI. Número de fêmeas de *Aedes aegypti* por *pool* positivo, data de coleta e semana epidemiológica dos mosquitos avaliados através do antígeno NS1, nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.

Estrato	Número de <i>A. aegypti</i> por <i>pool</i> positivo	Data da coleta	Semana
			epidemiológica
2	10	15.03.2011	11
5	10	13.01.2011	2
6	10	04.02.2011	5
7	10	06.01.2011	1
8	10	13.01.2011	2
8	10	02.02.2011	5
8	3	02.02.2011	5

4.3.2 Ovitrapa

Para detecção da transmissão transovariana, foram analisados 28% (2162) do total de *Aedes aegypti* coletados com a armadilha ovitrapa (7830), formando 206 *pools*. Não foi detectada transmissão transovariana em nenhuma amostra analisada (Tabela XXII).

Tabela XXII. *Pools* processados, *pools* positivos para o vírus do dengue e número de adultos de *Aedes aegypti* provenientes das armadilhas ovitrampas instaladas no município de Foz do Iguaçu e analisados pela técnica de RT-PCR.

Sexo	Número de mosquitos e <i>pools</i>	<i>A. aegypti</i>
♀	Nº mosquitos	1141
	<i>Pools</i> processados	110
	<i>Pools</i> positivos	0
♂	Nº mosquitos	1021
	<i>Pools</i> processados	96
	<i>Pools</i> positivos	0

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados bioecológicos

A Adultrap® apresentou elevada especificidade em capturar fêmeas de *Aedes aegypti*, fato já observado por Gomes *et al.* (2007). Mesmo em períodos com baixa frequência populacional, a armadilha detectou a presença de *A. aegypti* em todos os estratos e em todas as coletas.

O número de fêmeas de *Aedes aegypti* nos estratos foi entre 0,04 a 5,47 por 1000 habitantes, levando em consideração todos os habitantes do estrato. Gomes *et al.* (2008) em 2006/2007 também no município de Foz do Iguaçu utilizaram o índice estegômico modificado para adulto que leva em consideração apenas os habitantes dos domicílios sorteados na amostragem e encontraram a distribuição de fêmeas variando entre 5,68 e 43,00 por 1000 habitantes. Esses autores observaram 19 casos confirmados de dengue no município de Foz do Iguaçu quando o índice estegômico modificado para adulto estava acima de 25 fêmeas por 1000 habitantes. No presente trabalho foi observada elevada incidência de dengue a cada 100.000 habitantes nas semanas epidemiológicas 10, 11, 19 e 20, sendo que o número de fêmeas de *Aedes aegypti* coletadas nestas semanas foi no máximo 5,47 fêmeas a cada 1000 habitantes. Para que ocorra uma epidemia de dengue, bastam algumas fêmeas que realizam múltiplas alimentações sanguíneas em dois a três ciclos gonotróficos (FOCKS *et al.*, 1995; MORRISON *et al.*, 1998).

Maciel-de-Freitas *et al.* (2008), compararam a Adultrap® com outra armadilha de adultos, realizando experimentos de marcação, soltura e recaptura em área endêmica do Rio de Janeiro e observaram que a Adultrap® não apresenta diferença estatística significativa em relação ao número de fêmeas capturadas pela mosquiTRAP®, embora esta tenha capturado mais fêmeas que a primeira. No entanto, a mosquiTRAP® apresentava imaturos de *A. aegypti* após 18 dias de exposição no campo. Já a Adultrap® apresenta uma vedação que inviabiliza o contato da fêmea com a água prevenindo a ocorrência de oviposição na armadilha.

Foi possível detectar a presença de *Aedes aegypti* em todos os estratos e coletas realizadas no município de Foz do Iguaçu com a armadilha Adultrap®, no entanto, a ovitrampa não detectou ovos em alguns estratos das coletas de dezembro de 2008, maio e outubro de 2010. Ao contrário de Gama *et al.* (2007) que detectaram a presença dos mosquito *Aedes*, utilizando ovitrampas durante todo o período experimental (17 semanas), enquanto a armadilha de adulto MosquiTRAP® (armadilha para adultos) detectou a presença do mosquito por apenas 13 semanas.

Observamos a presença de armadilhas positivas em todos os estratos, com os índices de positividade de ovitrampas oscilando entre os estratos em um mesmo período e em um mesmo estrato nas 11 semanas epidemiológicas avaliadas, sendo que os valores mais elevados foram em fevereiro de 2009, maio de 2009 e março de 2010. Isso demonstra a ampla distribuição espacial de *Aedes aegypti* no município de Foz do Iguaçu. A maior densidade de ovos por armadilha também foi observada no mesmo período. A densidade de ovos é provavelmente um reflexo da densidade de vetores no ambiente (GOMES, 2002). No entanto observamos algumas áreas com elevada densidade de ovos e baixo índice de positividade de ovitrampas, o que demonstra que algumas regiões podem estar com focos de infestação de *A. aegypti*.

A armadilha ovitrampa coletou *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Esta espécie apresenta hábitos silvestres, com menor grau de domiciliação (FORATTINI, 2002), mas como observado pode frequentar o ambiente urbano. Até o momento, não há evidências que esta espécie seja transmissora do vírus da dengue nas Américas, no entanto seu potencial de transmissão não pode ser ignorado (PASSOS *et al.* 2003). A tendência dessa espécie em invadir o ambiente domiciliar pode potencializar a chance de infecção com vírus dengue.

Em relação aos casos de dengue os estratos foram classificados quanto ao grau de incidência de dengue de acordo com o Programa Nacional de Controle da Dengue: baixa incidência: menor que 100 por 100.000 habitantes; média incidência: 100 a 300 por 100.000 habitantes; elevada incidência: maior que 300 por 100.000 habitantes. Em 2008 e 2009 os estratos tiveram baixa incidência da doença, já em 2010 e 2011 todos os estratos tiveram elevada incidência da dengue. Em todos os anos analisados os picos dos casos de dengue sempre ocorreram no final do verão e no início do outono próximo a semana epidemiológica 15.

Observamos que em todos os estratos do município de Foz do Iguaçu é detectada a presença de *Aedes aegypti*. Quando ocorre epidemia de dengue como em 2010 e 2011, todos os estratos apresentaram elevada incidência de dengue, porém alguns foram mais afetados pela doença. Em situação epidêmica toda área urbana deve ser objeto de ações que reduzam a população do vetor, em que pese a não homogeneidade na distribuição espacial.

5.2 Detecção viral

A detecção dos sorotipos circulantes é de fundamental importância. No Paraná, atualmente circulam três sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. O DENV-4 recentemente foi reintroduzido no Brasil pelo Estado de Roraima e se dispersou por vários Estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O Paraná apresenta população de hospedeiros suscetíveis para este sorotipo, visto que nunca foi registrado caso autóctone de DENV-4 no Estado, apenas casos importados (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BALANÇO DENGUE, 2011). O grande problema é que existe uma subestimação dos sorotipos circulantes utilizando apenas a vigilância virológica em humanos. Em 2007 e 2008 foi detectado apenas o sorotipo DENV-3. Em 2009 não foi realizado isolamento viral nos casos humanos segundo o Centro de Controle de Zoonoses de Foz Do Iguaçu através dos dados do SINAN. O dado relevante e estratégico desta pesquisa foi a detecção da circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 em mosquitos em 2009, sendo que estes sorotipos estariam circulando nas epidemias subsequentes (2010 e 2011).

A armadilha Adultrap® e a técnica RT-PCR utilizadas foram capazes de detectar a presença do vírus mesmo em período de baixa transmissão. Os cinco *pools* de fêmeas de *Aedes aegypti* positivas pelo RT-PCR foram detectados em períodos com baixa incidência de dengue em 2009 (semana epidemiológica 6) Em períodos de elevada transmissão de dengue em 2010 (semana epidemiológica 10 e 11), nenhum *pool* foi detectado infectado. Méndez *et al.* (2006) utilizando aspiração em casas e escolas no Estado do Valle del Cauca, no sudoeste da Colômbia, encontraram diferenças significativas nas taxas mínimas de infecção entre os períodos epidêmicos (10,68) e inter-epidêmicos (3,46).

Alguns parâmetros utilizados nos procedimentos de coleta podem interferir no encontro de mosquitos infectados. Um deles seria a coleta de maneira direcionada nas casas de moradores com suspeita de dengue, que potencializa o encontro de amostras positivas para o vírus. Gu e Novak (2004) e Gu *et al.* (2008) comentam que as coletas de mosquitos devem ser realizadas em sítios sentinela com amostragem intensificada ao invés de numerosos sítios de amostragens, cada um com esforço amostral reduzido. Tais sítios podem ser locais com abundância de vetores ou com elevada incidência de dengue. É melhor intensificar as coletas em períodos de intensa densidade de vetores e casos dengue, para encontrar mosquitos infectados. No entanto este não seria um procedimento de vigilância virológica com intuito de preceder epidemias e sim uma constatação da epidemia.

O presente trabalho utilizou a vigilância do vírus nos mosquitos de todas as regiões do município em períodos interepidêmicos e de transmissão encontrando uma taxa mínima de infecção (TMI) de 2,7 mosquitos positivos para o vírus para 1000 analisados em períodos de baixa incidência de dengue. Urdaneta *et al.* (2005) coletaram mosquitos com método de aspiração no interior de casas de moradores com suspeita de dengue em Maracay (Venezuela), encontrando uma TMI de 17 fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas por 1000 analisadas, 8 semanas antes do aumento da incidência dos casos dengue. Garcia Rejon *et al.* (2008) coletando em casas de pacientes com dengue em Mérida no México, encontraram uma TMI de 17,5:1000 para *A. aegypti*. Esses autores localizaram fêmeas infectadas no domicílio até 27 dias após o início dos sintomas nos pacientes. Guedes *et al.* (2010) utilizando aspiração de mosquitos em casas com pacientes com suspeita de dengue em Recife (Pernambuco), encontraram TMI de 42,2 para fêmeas de *A. aegypti*, coletando até 50 fêmeas adultas em um domicílio apenas.

A armadilha utilizada para o monitoramento dos vetores, também influencia na detecção do vírus, principalmente no que diz respeito aos mosquitos continuarem vivos ou mortos dentro da armadilha. Mosquitos congelados vivos são pré-requisitos para muitas técnicas de detecção viral. Na armadilha Adultrap®, o mosquito permanece vivo e íntegro para monitoramento da circulação viral. A armadilha simula condições adequadas para repouso ou abrigo, após a alimentação sanguínea e antes da oviposição (GOMES *et al.*, 2007; DONATTI & GOMES 2007).

A Adultrap® apresenta elevada especificidade para capturar fêmeas grávidas (94%), porém não captura todas as fêmeas grávidas. De 10% a 20 % das fêmeas grávidas eram capturadas por dia no intradomicílio com aspiração nas casas onde eram retiradas as armadilhas Adultrap® (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2008). A fuga de fêmeas de *Aedes aegypti* da armadilha Adultrap® também já foi relatada, Lourenço-de-Oliveira e Maciel-de-Freitas (2012) observaram que o percentual de fêmeas grávidas que fugiram das armadilhas variou entre 5 e 15%, ao passo que as não grávidas tiveram uma frequência de fuga entre 25 e 32%. Ou seja, algumas fêmeas que não chegaram aos estágios de desenvolvimento ovariolar avançados podem ter fugido da armadilha em questão.

Outro fator importante é o local de instalação das armadilhas utilizadas para captura de vetores, ou seja, se estas são instaladas no intra ou peridomicílio. Devido a elevadas endofilia e antropofilia, o *Aedes aegypti* frequenta o domicílio humano para obter alimentação sanguínea e repouso (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BARATA *et al.*, 2001). Lima-Camara *et al.* (2006) realizando coletas com aspiração, coletaram mais fêmeas e machos de *A. aegypti* no intradomicílio do que no peridomicílio. Gomes *et al.*, (2007) capturou mais fêmeas no peridomicílio que no intradomicílio. Maciel-de-Freitas *et al.* (2008) não encontraram diferença significativa na instalação da armadilha Adultrap® nestes dois ambientes, pois no ambiente peridomiciliar pode ter ocorrido maior competição com outros recipientes peridomésticos. No presente estudo as coletas foram realizadas no ambiente peridomiciliar, e mesmo que este seja o ambiente com elevada densidade de fêmeas na armadilha, as fêmeas que estavam à procura de hospedeiro ou em repouso após a alimentação no interior das casas provavelmente não foram capturadas.

Maciel-de-Freitas *et al.* (2008) comparando a armadilha Adultrap® e o método de aspiração, observaram que não existe diferença significativa entre a densidade de fêmeas de *Aedes aegypti* capturadas, apesar da aspiração ser o método mais produtivo para captura de fêmeas deste vetor (SCHOELER *et al.*, 2004). Muitos trabalhos tiveram sucesso na detecção viral utilizando diferentes métodos de coleta e captura intradomiciliar. Alves da Costa *et al.* (2009) coletaram mosquitos com a técnica de aspiração no intra e peridomicílio em 46 bairros da Cidade de Manaus (Amazonas), encontrando 80% (138) dos *pools* de fêmeas de *A. aegypti* infectados para o vírus dengue. A maior prevalência de mosquitos infectados foi observada na

região Centro-Oeste. Chow *et al.* (1998) utilizando aspiração, detectaram o vírus dengue em 20,9% (110) dos *pools* de *Aedes aegypti* coletados no intradomicílio em Cingapura. De La Mora-Covarrubias *et al.* (2010) utilizando armadilha CDC de luz e CO₂ (gelo seco) no peridomicílio detectaram 57% (42) das amostras de fêmeas de *A. aegypti* infectadas no município de Juarez, Estado de Chihuahua, no México, georreferenciando os pontos de coleta de mosquitos com ampla abrangência do município.

O tamanho amostral interfere na detecção viral em mosquitos. Para o número amostral do presente trabalho (1871 fêmeas vivas de *Aedes aegypti*) a probabilidade de detecção do vírus dengue, levando em consideração uma taxa de infecção de 1 infectado por 1000 analisados, seria em torno de 0,8. Considerando a técnica de RT-PCR com 100% de sensibilidade e especificidade, além das fêmeas infectadas e não infectadas terem a mesma probabilidade de serem capturadas pelo método de amostragem (GU & NOVAK, 2004).

No entanto, sabe-se que a qualidade do ácido nucléico é bastante afetada pela coleta da amostra, manuseio e transporte. O resultado negativo pode ser decorrente da degradação do RNA alvo e não pela ausência do agente etiológico (ANWAR *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2010). Alguns trabalhos conseguem detectar o vírus dengue por RT-PCR mesmo em mosquitos mortos. Bangs *et al.*, (2001) detectaram *pools* infectados 28 dias após a morte dos mosquitos. Bangs *et al.*, (2007) detectaram o vírus em mosquitos secos até 13 semanas após a exposição a temperaturas elevadas de 26,3°C a 31,7°C e umidade relativa de 49,4% a 69,9%. No presente trabalho não foi detectado vírus em mosquitos que estavam mortos por pelo menos 24 horas e que foram congelados em nitrogênio líquido. Apesar da fácil degradação do RNA esta é uma técnica que fornece o resultado em poucas horas, deste a extração até a análise no gel de poliacrilamida o tempo médio gasto é de oito horas. Assim pode-se analisar elevado número de fêmeas simultaneamente.

A atividade de degradação das RNAses no RNA continua a -20°C (MELO *et al.*, 2010). Na presente pesquisa não foi detectado vírus nas amostras coletadas em residências de moradores com suspeita de dengue, através da técnica de RT-PCR. Provavelmente pelas amostras terem sido armazenadas em freezer-20°C até serem transportadas ao laboratório. Entretanto, a técnica de detecção do antígeno NS1 apresentou resultados positivos para o vírus dengue em sete *pools* dos 31 analisados, porém os sorotipos não foram determinados, uma vez que o método em

questão não é capaz de diferenciá-los. Esta técnica se mostrou extremamente promissora para análise dos mosquitos em campo, detectando *pools* positivos de mosquitos em períodos de baixa e elevada transmissão em humanos. Para investigar a entrada de um novo sorotipo ou genótipo circulante é necessário que após a triagem com o método de detecção do antígeno NS1 as amostras sejam avaliadas por outras técnicas como, por exemplo, isolamento viral ou RT-PCR. Entretanto, para realização destes testes a partícula viral deve estar íntegra, para detecção do sorotipo. A detecção da proteína NS1 não indica necessariamente que a partícula viral esteja íntegra ou infectante (SILVA *et al.*, 2011)

Todos os espécimes machos de *Aedes aegypti* foram negativos pela técnica RT-PCR. Isto pode ter sido devido ao baixo número de espécimes coletados durante o período de estudo, ou baixa taxa de infecção. Os machos podem se infectar através da transmissão transovariana (ROSEN *et al.*, 1983) ou venérea (ROSEN, 1987). Kow *et al.* (2011) provaram que mosquitos machos podem estar infectados em ambiente natural, no entanto apresentam uma baixa taxa de infecção (0,133%).

A transmissão transovariana pode fornecer um mecanismo para permitir que o vírus sobreviva no mosquito em períodos interepidêmicos (JOSHI *et al.*, 2002). É também um mecanismo de dispersão do vírus, visto que ovos podem ser dispersos passivamente em diversas áreas geográficas. Por esse motivo o controle mecânico dos criadouros, que fornecem condições adequadas para o desenvolvimento das formas imaturas, deve ser enfatizado e priorizado (ROHANI *et al.*, 2008). No presente trabalho, utilizando RT-PCR, nenhum dos 206 *pools* de *Aedes aegypti* (2162) proveniente das armadilhas ovitrampas estavam infectados

A transmissão transovariana ocorre numa taxa menor que a transmissão horizontal. Muitos trabalhos apresentam resultados negativos na detecção da transmissão transovariana (PINHEIRO *et al.*, 2005; ZEIDLER *et al.*, 2008), no entanto, outros apresentam resultados mais promissores. Khin e Than (1983) no Sudeste Asiático encontram uma taxa mínima de infecção de 1: 2067 para as larvas analisadas e 1: 3865 para os adultos machos criados a partir de larvas coletadas no campo. No Estado de Minas Gerais em Belo Horizonte, Pessanha *et al.* (2011) testaram larvas individuais e *pools* de *Aedes aegypti*. Dos *pools* testados 163 (37,4%) de 435 eram positivos, incluindo 32 (10,9%) das 293 amostras individuais que foram concomitantemente positivas para dois sorotipos. Isso demonstra que a co-infecção pode ser repassada via transmissão transovariana. Guedes *et al.* (2010)

analisaram 2672 (139 *pools*) machos e fêmeas de *A. aegypti* em Recife para detecção da transmissão transovariana, encontrando 12,2% dos *pools* positivos correlacionando com os mesmos sorotipos que circulavam nos casos humanos.

Não foram detectados *Aedes albopictus* infectados, avaliados com a técnica de RT-PCR. O número de exemplares testado foi reduzido (14 indivíduos). As armadilhas foram instaladas no ambiente urbano, no entanto esta espécie tem preferência por áreas rurais em detrimento a áreas urbanas e suburbanas (LIMA-CAMARA *et al.*, 2006). Até o momento, não há evidências que esta espécie seja transmissora do vírus dengue nas Américas, no entanto sua competência vetorial para 23 arboviroses não pode ser ignorada (MOORE & MITCHELL, 1997; PASSOS *et al.*, 2003), com destaque para o vírus dengue e febre amarela (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). Lourenço-de-Oliveira *et al.* (2002) tentaram isolar o vírus dengue em 80 exemplares de *A. albopictus* no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, obtendo resultados negativos.

Alguns trabalhos obtiveram resultados positivos, no entanto nenhum conseguiu a confirmação epidemiológica do envolvimento de *A. albopictus* na transmissão do dengue. Serufo *et al.* (1993) isolaram o vírus DENV-1 em cultura de células de *A. albopictus* C6/36, a partir de larvas de *A. albopictus* coletadas em Campos Altos, Minas Gerais. Guedes (2006) analisando 34 *pools* de adultos de *A. albopictus* pela técnica de RT-PCR, no município de Moreno (Pernambuco) detectaram um *pool* formado por duas fêmeas coletadas na forma adulta, positivo para o vírus DENV-1. Pela primeira vez no Brasil Cecílio *et al.* (2009) encontraram elevadas taxas de infecção em larvas de *A. albopictus*, realizando coletas na região da Pampulha Minas Gerais, encontraram 48,6% (72) dos *pools* de larvas positivas para vírus dengue. Chung e Pang (2002) detectaram por RT-PCR 67 (2.9%) de 2256 *A. albopictus* em Cingapura. Também em Cingapura Chow *et al.* (1998) detectaram a taxa mínima de infecção de 50 *A. albopictus* infectados para cada 1.000 mosquitos testados. Em Cingapura, *Aedes aegypti* é o principal vetor envolvido na transmissão do vírus dengue e o *A. albopictus* é abundante em áreas urbanas desempenhando um papel secundário na transmissão do agente etiológico.

A vigilância entomológica contínua do vírus da dengue nas populações de *Aedes aegypti* em campo é uma ferramenta poderosa para monitorar os sorotipos circulantes, bem como a entrada de novos sorotipos, a fim de orientar as medidas de controle do vetor com agilidade. Para que a vigilância virológica ocorra de forma

efetiva é necessária a captura do maior número de fêmeas possíveis no campo tanto no ambiente intradomiciliar quanto no peridomiciliar. Com talvez mais de um método de captura para garantir a coleta em grande escala de vetores. Além dessa vigilância acarretaria a redução da população do vetor. A Adultap® pode ser uma alternativa utilizada na detecção viral em vetores, visto que seu custo é baixo e utiliza apenas água de torneira como atrativo (GOMES *et al.*, 2008).

Em relação à detecção viral, com a técnica RT-PCR é necessário o congelamento imediato dos mosquitos e todas as precauções possíveis para evitar a degradação do RNA, o que é muito arriscado em larga escala, além dos custos envolvidos, pois cada *pool* de mosquitos custa em média R\$ 42,18 (Quarenta e dois reais e dezoito centavos) (Anexo). Uma alternativa para a vigilância virológica em mosquitos é a utilização da captura do antígeno NS1, método menos custoso que o RT-PCR (aproximadamente R\$ 16,00 por *pool* – dezesseis reais) sendo capaz de detectar o vírus dengue em mosquitos não necessariamente congelados à temperatura -70°C, o que facilita a operacionalização da vigilância virológica. No entanto, a detecção do antígeno NS1 não diferencia os sorotipos virais, mas pode ser utilizada como triagem dos *pools* de mosquitos infectados com vírus dengue.

6 CONCLUSÕES

1. Todos os estratos do município de Foz do Iguaçu apresentam infestação de *Aedes aegypti*.
2. Todos os estratos do município de Foz do Iguaçu apresentaram baixa incidência de dengue em 2008 e 2009 e elevada incidência em 2010 e 2011.
3. Foram detectados através da técnica RT-PCR 2,26% dos *pools* de fêmeas de *Aedes aegypti* congeladas vivas infectadas com os sorotipos 1 e 2 do vírus do dengue em períodos de baixa incidência de dengue. Já nos mosquitos que estavam mortos na armadilha, não foi detectado vírus do dengue.
4. Não foi encontrado *Aedes albopictus* infectado através da técnica RT-PCR.
5. Foram detectados 22,6% de *pools* infectados com vírus do dengue por meio da detecção do antígeno NS1 nas residências de moradores com suspeita de dengue.
6. A armadilha Adultrap® é uma ferramenta eficaz para detecção do vírus dengue em mosquitos, pois detectou *pools* infectados mesmo em períodos de baixa transmissão de dengue. Além de apresentar especificidade para capturar fêmeas de *A.aegypti* e estas permanecerem vivas.
7. Não foi detectada a transmissão venérea ou transovariana em *Aedes aegypti*.

7 REFERÊNCIAS

ACOSTA-BAS, C.; GÓMEZ-CORDERO, I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. **Revista Biomédica**, v. 16, p. 113-137, 2005.

AHMED, A. Diagnosing dengue fever. **Infectious Diseases Journal of Pakistan**, v. 14, p. 129-132, 2005.

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 376-381, 2002.

ALENCAR, C. H. M.; ALBUQUERQUE, L. M.; AQUINO, T. M. F.; SOARES, C. B.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; LIMA, J. W. O.; PONTES, R. J. S. Potencialidades do *Aedes albopictus* como vetor de arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária. **Revista APS**, v. 11, p. 459-467, 2008.

ALVES DA COSTA, C.; SANTOS, I. G. C.; BARBOSA, M. G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 677-681, 2009.

ANWAR, A.; WAN, G.; CHUA, K. B.; AUGUST, J. T.; TOO, H. P. Evaluation of pre-analytical variables in the quantification of dengue virus by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, p. 537-542, 2009.

BANGS, M. J.; TAN, R.; LISTIYANINGSIH, E., KAY, B. H.; PORTER, K. P. Detection of Dengue Viral RNA in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Sticky Lures Using Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, p. 720-724, 2001.

BANGS, M. J., PUDIANTARI, R.; GIONAR, Y. R. Persistence of Dengue Virus RNA in Dried *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Natural Tropical Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 163-167, 2007.

BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; CHIARAVALLOTI, N., GLASSER, C. M.; BARATA, J. M. S.; NATAL, D. *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in Southeast Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 237-242, 2001.

BARREIRA, L. A. C.; MACHADO, A. M.; AQUINO, V. H.; BADRA, S. J.; FIGUEIREDO, L. T. M. (2010). Padronização e uso de um método imunoenzimático que utiliza células infectadas como antígeno no diagnóstico rotineiro do dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 268-271, 2010.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 115–137, 2000.

BRONZONI, R. V. M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian *Alphaviruses* and *Flaviviruses*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 696-702, 2005.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597–601, 2005.

CASTRO, M. G.; NOGUEIRA, R. M. R., SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Dengue vírus detection by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99; p. 809-814, 2004.

CECÍLIO, A. B.; CAMPANELLI, E. S.; SOUZA, K. P. R.; FIGUEIREDO, L. B.; RESENDE, M. C. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 123-127, 2009.

CHOW, V. T. K.; SEAH, C. L. K.; CHAN, Y. C. Use of NS 3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other *Flaviviruses*. **Archives of Virology**, v. 133, p. 157-170, 1993.

CHOW, V. T. K.; CHAN, I. C.; YONG, R.; LEE, K. M.; LIM, L. K.; CHUNG, Y. K.; LAM-PHUA, S. G.; TAN, B. T. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 578–586, 1998.

CHUNG, Y.K.; PANG, F.Y. Dengue virus infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, p. 322–330, 2002.

CONSOLI, R. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 225 p. 1994.

DE LA MORA-COVARRUBIAS, A.; JIMÉNEZ-VEJA, F.; TREVIÑO-AGUILAR, S. M. Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. **Salud Pública México**, v. 52, p. 127-133, 2010.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 390-398, 2004.

DEGALLIER, N.; TEIXEIRA, J. M. S.; SOARES, S. S.; PEREIRA, R. D., PINTO, S. C. F.; CHAIB, A. J. M.; VASCONCELOS, P.F.C.; OLIVEIRA, E. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 386-387, 2003.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, p. 259-272, 2002.

DONATTI, J. E.; GOMES, A. C. Adultrap: Descrição de armadilha para adulto de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, p. 255-256, 2007.

EISEN, A.; BEATY, B. J.; MORRISON, A. M.; SCOTT, T. W. Proactive vector control strategies and improved monitoring and evaluation practices for dengue prevention. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1245-1255, 2009.

ENDY, T. P.; WEAVER, S. C.; HANLEY, K. A. Dengue virus - past, present and future. In: HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C. (Ed.). **Frontiers in Dengue Virus Research**. Horizon Press, Norwich, U.K., p. 3-9, 2010.

ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A. Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 165-256, 2006.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition sites as surveillance methods for *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 26, p.531-535, 1966.

FOCKS, D. A.; DANIELS, E.; HAILE, D. G.; KEESLING, J. E. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 489-506, 1995.

FORATTINI, O. P. **Ecologia, epidemiologia e sociedade**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo/Livraria Editora Artes Médicas Ltda., 529 p., 1992.

_____. **Culicidologia Médica**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, v. 2, 860 p., 2002.

GAMA, R. A.; SILVA, E. M.; SILVA, I. M.; RESENDE, M. C.; EIRAS, A. E. Evaluation of the sticky MosquiTRAP™ for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) during the dry season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, 2007, v. 36, p. 294-302, 2007.

GARCIA-REJON. J.; LORONO-PINO, M. A.; FARFAN-ALE, J. A.; FLORES-FLORES, L.; ROSADO-PAREDES E. D. P.; RIVERO-CARDENAS, N.; NAJERA-VAZQUEZ, R.; GOMEZ-CARRO, S.; LIRA-ZUMBARDO, V.; GONZALEZ-MARTINEZ, P.; LOZANO-FUENTES, S.; ELIZONDO-QUIROGA, D.; BEATY, B. J.; EISEN, L. Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 940-950, 2008.

GOMES, A. C. Medidas de níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. **Informe epidemiológico do SUS**, v. VII, p. 49-57, 1998.

_____. Vigilância entomológica. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 11, p. 79-90, 2002.

GOMES, A. C.; SILVA, N. N.; BERNAL, R. T. I.; LEANDRO, A. S.; CAMARGO, N. J.; SILVA, A. M.; FERREIRA, A. C.; OGURA, L. C.; OLIVEIRA, S. J.; MOURA, S. M. Especificidade da armadilha Adultrap para capturar fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 216-219, 2007.

GOMES, A. C.; SILVA, N. N.; BERNAL, R. T. I.; LEANDRO, A. S. Estimação da infestação predial por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) por meio da armadilha Adultrap®. **Epidemiologia Serviço e Saúde**, v. 17, p. 293-300, 2008.

GU, W.; NOVAK, R. J. Short report: detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 636–638, 2004.

GU W.; UNNASCH, T. R.; KATHOLI, C. R.; LAMPMAN, R.; NOVAK, R. J. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 817-822, 2008.

GUEDES, D. R. D. Epidemiologia molecular do *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Dissertação apresentada ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 78 p., 2006.

GUEDES, D. R. D.; CORDEIRO, M. T.; MELO-SANTOS, M. A. V.; MAGALHAES, T.; MARQUES, E.; REGIS, L.; FURTADO, A. F.; AYRES, C. F. J. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal Vector Borne Disease**, v. 47, p. 67–75, 2010.

GUIMARÃES, A. E. Dengue no Rio de Janeiro: 250 anos de história. **Entomologia y Vectores**, v. 9, p. 195-200, 2002.

GUIMARÃES, A. E.; LOPES, C. M.; MELLO, R. P.; ALENCAR, J. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em áreas do parque Nacional do Iguazu, Brasil.1- Distribuição por hábitat. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 1107-1116, 2003.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis advances and challenges. **International Journal Infectious Diseases**, p. 8, p. 69-80, 2004

HARRIS, E.; ROBERTS, T. G.; SMITH, L.; SELLE, J.; KRAMER, L. D.; VALLE S.; SANDOVAL, E; BALMASEDA, A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2634-2639, 1998.

IBGE, 2011. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 18/11/2011.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, p.158-161, 2002.

KHIN, M. M.; THAN, A. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 590-594, 1983.

KOW, C. Y.; KOON, L. L.; YIN, P. F. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. **Journal Medical Entomology**, v. 38, p. 475-479, 2001.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 72, p. 27-41, 1998.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 71-92, 2008.

LAMBRECHTS, L.; CHEVILLON, C.; ALBRIGHT, R. G.; THAISOMBOONSUK, B.; RICHARDSON, J. H.; JARMAN, R. G.; SCOTT, T. W. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 160-171, 2009.

LAMBRECHTS, L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? **Trends in Parasitology**, v. 1007, p. 1-4, 2011.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, p. 545-551, 1992.

LIMA, M. D. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; SANTO, S. F. B. D. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, e738, 2010.

LIMA-CAMARA, T. N.; HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Freqüência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 2079-2084, 2006.

LIOTTA, D. J.; CABANNE, G.; CAMPOS, R.; TONON, S. A. Molecular detection of dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* mosquitoes from northeastern Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 47, p. 82-87, 2005.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; HONÓRIO, N. A.; CASTRO, M. G.; SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; ALVES, J. C. R. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 799-800, 2002.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; BISPO-DE-FILIPPIS, A. M; FAILLOUX, A. B. *Aedes albopictus* from Brazil and southern United States: genetic variation and vector competence for dengue and yellow fever viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 105-115, 2003.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; MACIEL-DE-FREITAS, R. **Avaliação comparativa da eficiência de armadilhas para captura de adultos de *Aedes aegypti***. Relatório Apresentado à Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://berdon.com.br/publicacoes/RELAT%C3%93RIODAAVALIA%C3%87%C3%83ODAADULTRAPPELAFIOCRUZ.pdf>. Acesso em 12/01/2012.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; PERES, R. C.; ALVES, F.; BRANDOLINI, M. B. Mosquito traps designed to capture *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females: preliminary comparison of Adultrap, MosquiTRAP and backpack aspirator efficiency in a dengue-endemic area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 602-605, 2008.

MALAVIGE, G. N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. J.; SREVRATNE, S. L. Dengue viral infectious. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, p. 588-601, 2007.

MELO, M. R.; MARTINS, A. R.; BARBOSA, I. V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 375-381, 2010.

MÉNDEZ, F.; BARRETO, M. ; ARIAS, J. F.; RENGIFO, G.; MUÑOZ, J.; BURBANO, M. E.; PARRA, B. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 678-683, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil - LIRAA. Metodologia para avaliação dos índices do Breteau e Predial**. Brasília DF, 59 p., 2005.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: Diagnóstico e manejo clínico**. 3ª edição, Brasília, 28 p., 2007.

_____, 2010. Nota técnica **Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_denv_4_24_09_2010_eh.pdf. Acesso em 01/12/2011.

_____, 2011. Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf Acesso em 02/03/2012.

MOORE, C.G.; MITCHELL C.J. *Aedes albopictus* in the United States: Ten-year presence and public health implications. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 329-334, 1997.

MORITA, K.; TANAKA, M.; IGARASHI, A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2107-2110, 1991.

MORRISON, A. C.; GETIS, A.; SANTIAGO, M.; RIGAU-PEREZ, J. G.; REITER, P. Exploratory space-time analysis of reported dengue cases during an outbreak in florida. Puerto Rico, 1991-1992. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 287-298, 1998.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13. 2004.

PASSOS, R. A.; MARQUES, G. R. A. M.; VOLTOLINI, J. C.; CONDINO, M. L. F. Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 729-734, 2003.

PESSANHA, J. E. M.; CAIAFFA, W. T.; CECÍLIO, A. B.; IANI, F. C. M.; ARAUJO, S. C.; NASCIMENTO, J. C.; KROON, E. G.; PROIETTI, F. A.; ARIAS, J. R. 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**, v. 44, p.103-105, 2011.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P.; BARROS, P. M. S. S.; VASCONCELOS, P. F. C.; CRUZ, A. C. R. Detection of dengue vírus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 833-839, 2005.

RAMAZAMY, M. S.; SRIKRISHNARAJ, K. A.; HADJIRIN, N.; PERERA, S.; RAMASAMY, R. Physiological aspects of multiple blood feeding in the malaria vector *Anopheles tessellatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 151-1059, 2000.

ROHANI, A.; ZAMREE, I.; JOSEPH, R. T.; LEE, H. L. Persistency of transovarial dengue virus in *Aedes aegypti* (Linn.). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v. 39, p. 813-816, 2008.

ROMANOS, M. T. V. Febre amarela e dengue. In: SANTOS, N. S. O.; Wigg, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., v. 1, p. 399-409, 2008.

ROSEN, L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 398-402, 1987.

ROSEN, L.; SHROYER, D. A.; TESH, R. B.; FREIER, J. E.; LIEN, J. C. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 1108 – 1119, 1983.

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

SANTOS, F. B.; MIAGOSTOVICH, M. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; EDGIL, D.; SCHATZMAYR, H. G.; RILEY, L. W., HARRIS, E. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 991-995, 2002.

SCHOELER, G. B.; SCHLEICH, S. S.; MANWEILLER, S. A.; SIFUENTES, V. L. Evaluation of surveillance devices for monitoring *Aedes aegypti* in an urban area of northeastern Peru. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 20, p. 6-11, 2004.

SEAH, C. L. K.; CHOW, V. T. K.; TANA, H. C.; CHAN, Y. C. Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. **Journal of Virological Methods**, v. 51, p. 193-200, 1995.

SERUFO, J. C.; OCA, H. M.; TAVARES, V. A.; SOUZA, A. M.; ROSA, R. V.; JAMAL, M. C.; LEMOS, J. R.; OLIVEIRA, M. A.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 503-504, 1993.

SERUFO, J. C.; NOBRE, V.; RAYES, A.; MARCIAL, T. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Dengue: uma nova abordagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 465-476, 2000.

SILVA, F. G. da; SILVA, S. J. S.; ROCCO, I. M.; SILVEIRA, V. R.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; BISSORDI, I. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo. **Bepa**, v. 8, p.14-26, 2011.

SINGH, N.; SHARMA, K. A.; DADHWAL, V.; MITTAL, S.; SELVI, A. S. A successful management of dengue fever in pregnancy: report of two cases. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, p. 377-380, 2008.

THENMOZHI, V.; KABILLAN, L.; SAMUEL, P.; DASH, A. P. Detection of dengue virus antigens in desiccated mosquitoes: an improved tool for surveillance. **Tropical Medicine & International Health**, v. 10, p. 187-189, 2005.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; DÉGALLIER, N.; VASCONCELOS, P. F. C.; RODRIGUES, S. G.; CRUZ, A. C. R. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudos. **Documento técnico nº 2, Instituto Evandro Chagas, Fundação Nacional de Saúde**, p. 1-46, 1994.

URDANETA, L.; HERRERA, F.; PERNALETE, M.; ZOGHBI, N.; RUBIO-PALIS, Y.; BARRIOS, R.; RIVERO, J.; COMACH, G.; JIMÉNEZ, M.; SALCEDO, M. (2005). 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**, v. 5, p. 177-84, 2005.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 254–298, 2006.

WHITE, L. A. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 Cells to Viral Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1221-1224, 1987.

WIKAN, N., KUADKITKAN, A.; SMITH, D.R. The *Aedes aegypti* cell line CCL-125 is dengue virus permissive. **Journal of Virological Methods**, v. 157, p. 227–230, 2009.

ZEIDLER, J. D.; ACOSTA, P. A. A.; BARRETO, P. P.; CORDEIRO, J. S. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, p. 986-991, 2008.

ZHOU, G.; JAMES, E. P.; WELLS, M. A. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. **Insect Biochemistry Molecular and Biology**, v. 34, p. 919-925, 2004.

CAPÍTULO III

***Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE):
PERFIL GENÉTICO E RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM ÁREA DE TRÍPLICE
FRONTEIRA NO SUL DO BRASIL**

RESUMO

A variabilidade genética do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) muitas vezes é reduzida devido à intensa pressão de seleção ocasionada pela ação do controle químico que é realizada para combater o mosquito. O objetivo do trabalho foi avaliar o *status* de suscetibilidade de larvas e adultos a inseticidas químicos, a frequência da mutação Val1016Ile relacionada com a resistência a piretróides e a variabilidade genética do fragmento do gene mitocondrial ND4 em populações de *A. aegypti* do município Foz do Iguaçu, Paraná. Foram realizados bioensaios com concentrações múltiplas e diagnóstica de temephos com mosquitos coletados em 2008, nas análises Foz do Iguaçu foi dividida em três regiões: Norte (1, 2 e 3), Central (5, 6 e 7) e Sul (9, 10 e 11). Nos bioensaios com deltametrina e cipermetrina foram realizados apenas ensaios com a concentração diagnóstica (CD) em vetores coletados em 2008. Para análise da diversidade genética e mutação Val1016Ile, o município foi dividido em 11 estratos, onde foram amostrados adultos de *A. aegypti* em quatro períodos de coleta dezembro de 2008; fevereiro, maio e outubro de 2009. A partir da dose diagnóstica 0,0162 ppm de temephos as populações de *A. aegypti* das regiões Norte, Central e Sul apresentaram mortalidade de 85% (alteração na suscetibilidade), 71% (resistente) e 77% (resistente) e razões de resistência (RR95) de 3,8, 4,1 e 4,6, respectivamente. A população de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu mostrou-se resistente aos piretróides, com mortalidade de 72,2% para cipermetrina (CD:146 mg i.a./m²) e 57% para deltametrina (CD:18 mg i.a./m²). Fato que corrobora o encontro do alelo da mutação 1016Ile em todos os estratos. Dos 234 espécimes genotipadas para a mutação Val1016Ile, 15% eram homocigotos dominantes para o alelo selvagem (Val/Val); 62% foram heterocigotos (Val/Ile) e 23% foram homocigotos recessivos para a mutação (Ile/Ile). Na área urbana, a distribuição espacial dos genótipos que apresentam a mutação Val1016Ile não foi aleatória. Com relação a distribuição dos haplótipos do fragmento do gene mitocondrial ND4, 93 e 7% das amostras apresentaram os haplótipos 1 e 2, respectivamente, totalizando 11 sítios polimórficos. A diversidade genética foi reduzida ($Hd: 0,131 \pm 0,035$; $\pi: 0,00475 \pm 0,00127$), sugerindo uma redução no tamanho da população que pode ter sofrido um “efeito gargalo de garrafa” recente. O índice de fixação não significativo e o fluxo gênico elevado sugerem a homogeneidade genética das linhagens mitocondriais de *A. aegypti* presentes nos estratos analisados. As duas linhagens mitocondriais analisadas apresentam o alelo recessivo para a mutação Val1016Ile. As ações de controle do *A. aegypti* em Foz do Iguaçu utilizando temephos e piretróides podem ser comprometidas devido à perda de suscetibilidade do vetor a estes inseticidas. Populações de *Aedes aegypti* que sofreram “efeito gargalo de garrafa” e apresentam resistência a piretróides podem mudar aspectos importantes relacionados à competência e capacidade vetorial.

Palavras-chave: Diversidade genética. DNA mitocondrial. mutação *kdr*. *Aedes aegypti*. Temephos.

ABSTRACT

The genetic variability of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) is often reduced due to intense selection pressure caused by the action of chemical control that is done to mosquito's combat. This study evaluate the susceptibility status of larvae and adults to chemical insecticides, the mutation frequency Val1016Ile associated with resistance to pyrethroids and genetic variability of the mitochondrial ND4 gene fragment in populations of *A. aegypti* in the city of Foz do Iguacu, Paraná. Bioassays were performed with multiple and diagnostic concentrations of temephos with mosquitoes collected in 2008 in analyzes Foz do Iguacu was divided into three regions: North (1, 2 and 3), Central (5, 6 and 7) and South (9, 10 and 11). Bioassays with deltamethrin and cypermethrin were conducted only with a diagnostic concentration (DC) with vectors collected in 2008. To analyze the genetic diversity and mutation Val1016Ile, the city was divided into 11 strata an adults of *A. aegypti* was sampled in four periods in December 2008; February, May and October 2009. From the diagnostic dose of temephos, 0.0162 ppm, populations of *A. aegypti* in the North, Central and South showed mortality of 85% (alteration in susceptibility), 71% (resistant) and 77% (resistant) and resistance ratios (RR95) of 3.8, 4.1 and 4.6, respectively. Populations of *A. aegypti* in Foz do Iguacu showed resistance to pyrethroids, with a mortality of 72.2% for cypermethrin (DC: 146 mg i.a./m²) and 57% for deltamethrin (DC: 18 mg i.a./m²). This corroborates the meeting of the mutated allele 1016Ile in all strata. Of the 234 samples genotyped for the mutation Val1016Ile, 15% were homozygous dominant for the wild allele (Val/Val), 62% were heterozygous (Va/Ile) and 23% were homozygous for the recessive mutation (Ile/Ile). In urban areas, the spatial distribution of genotypes that have the mutation Val1016Ile was not random. Regarding the distribution of haplotypes of mitochondrial ND4 gene fragment, 93 and 7% of the samples had haplotypes 1 and 2, respectively, having a total of 11 polymorphic sites. Genetic diversity was low (HD: 0.131 ± 0.035, π: 0.00475 ± 0.00127), suggesting a reduction in the size of the population who may have suffered a bottleneck effect recently. The no significant fixation index and the high gene flow, suggest a genetic homogeneity of the mitochondrial lineages of *A. aegypti* present in strata analyzed. The two mitochondrial lineages analyzed have the recessive allele for mutation Val1016Ile. The control of the *A. aegypti* in Foz do Iguacu using temephos and pyrethroids may be compromised due to loss of vector susceptibility to these insecticides. Populations of *A. aegypti* that had suffered bottleneck effect and show resistance to pyrethroids, may have important aspects related to competence and vectorial capacity changed.

Key Words: Genetic variation. Mitochondrial DNA. *kdr* mutation. *Aedes aegypti*. Temephos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência ao organofosforado temephos

O temephos ($C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$) é um pesticida organofosforado usado extensivamente em várias partes do mundo no controle de vetores biológicos de diversos agentes etiológicos. Foi introduzido no mercado em 1965, pela *American Cyanamid Company*. Este composto é aplicado como larvicida, em ciclos bimestrais, em água estagnada e em reservatórios de água potável para uso doméstico. No Brasil, desde a implantação do Plano para Erradicação do *Aedes aegypti* em 1996 o uso deste organofosforado em programas de saúde pública foi ampliado com aproximadamente de 5 mil toneladas de inseticida por ano (MELO *et al.*, 2008). Em julho de 2001, a meta de erradicar *A. aegypti* do País foi abandonada passando a se trabalhar com o objetivo de controlar o vetor conforme o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue e o atual Programa Nacional de Controle da Dengue (BRAGA & VALLE, 2007b).

Devido à intensa utilização destes inseticidas as linhagens resistentes de insetos são selecionadas. A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte (BRAGA & VALLE, 2007a). Estes insetos selecionados apresentam mecanismos de resistência capazes de desestabilizar a ação do inseticida sobre seu organismo.

Os organofosforados atuam inibindo a acetilcolinesterase (AChE), enzima que inativa o neurotransmissor acetilcolina durante o impulso nervoso. A AChE é fosforilada pelo inseticida e fica irreversivelmente inativada. A inibição resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses, impedindo a interrupção da propagação dos impulsos nervosos. O sistema nervoso central continua sendo estimulado, desencadeando a morte do inseto (BRAGA & VALLE, 2007a).

Os primeiros registros de alteração na suscetibilidade ao larvicida temephos foram registrados por Macoris *et al.* (1995), com populações de *Aedes aegypti* de Goiânia e Marília, confirmando a necessidade de monitoramento das populações expostas a este inseticida. Muitos trabalhos demonstram o *status* de suscetibilidade ao temephos em diversas populações de *A. aegypti* brasileiras (Tabela I).

Tabela I. *Status* de suscetibilidade ao temephos de algumas populações brasileiras de *Aedes aegypti*.

Estado	Localidade	Ano	Status	Referência
Espírito Santo	Cariacica, Vitória	1999	Alteração da suscetibilidade	Lima <i>et al.</i> (2003)
Espírito Santo	Vilha Velha	1999	Resistente	Lima <i>et al.</i> (2003)
São Paulo	Bauru, Marília e Presidente Prudente	1999	Suscetível	Macoris <i>et al.</i> (2003)
São Paulo	Araçatuba, Barretos, Campinas, Pirituba, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto,	1999	Alteração da suscetibilidade	Macoris <i>et al.</i> (2003)
São Paulo	Santos	1999	Resistente	Macoris <i>et al.</i> (2003)
Distrito Federal	Taguatinga, Guará e Núcleo Bandeirante	2000	Resistente	Carvalho <i>et al.</i> (2001)
Distrito Federal	Gama, Sobradinho e Planaltina	2000	Alteração da suscetibilidade	Carvalho <i>et al.</i> (2001)
Distrito Federal	Ceilândia	2000	Suscetível	Carvalho <i>et al.</i> (2001)
Alagoas	Maceió, Arapiraca	2001	Resistente	Braga <i>et al.</i> (2004)
Sergipe	Aracaju, Barra dos Coqueiros; Itabaiana	2001	Resistente	Braga <i>et al.</i> (2004)
Rio de Janeiro	Campos dos Goytacazes, Duque de Caxias, Niterói, Nova Iguaçu, São Gonçalo, São João de Meriti	2001	Resistente	Braga <i>et al.</i> (2004)
Ceará	Fortaleza, Barbalha, Crato, Juazeiro do Norte	2003	Resistente	Lima <i>et al.</i> (2006)
Paraíba	Boqueirão, Brejo dos Santos, Campina Grande, Sítios Piabas, Capim de Cheiro, Lagoa do mato	2003/2004	Resistente	Beserra <i>et al.</i> (2007)
Paraná	Ubiratã, Santa Helena	2006/2007	Suscetível	Prophiro <i>et al.</i> (2011)
Paraná	Foz do Iguaçu	2006/2007	Resistente	Prophiro <i>et al.</i> (2011)

A confirmação da resistência ao temephos, detectada em vários municípios brasileiros, motivou a substituição do temephos por outros métodos de controle, de diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), análogos ao hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina. Desde 1999, laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* (MoReNAa) realizam provas de susceptibilidade das populações brasileiras de *A. aegypti* ao temephos (BRAGA & VALLE, 2007b).

As populações que apresentam suscetibilidade ao temephos são continuamente monitoradas, para evitar que estas atinjam razão de resistência elevada e possivelmente no futuro o mesmo inseticida possa ser utilizado novamente como mais uma alternativa no manejo dos inseticidas. Melo-Santos *et al.* (2010) demonstraram em laboratório que a interrupção do uso de inseticidas ou a interrupção combinada com a introdução de indivíduos suscetíveis em populações com elevada razão de resistência a temephos não foram suficientes para reverter as populações com elevado níveis de resistência para um *status* de suscetibilidade completo. Muitas vezes a persistência de resistência ao temephos, nos município que não utilizam este inseticida, pode ser devido à migração de mosquitos resistentes a partir de outras áreas.

1.2 Resistência a piretróides – Alteração do sítio alvo

Os piretróides são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas. Surgiram como uma alternativa a aqueles inseticidas de maior potencial tóxico (DDT). São utilizados desde a década de 70, em programas de saúde pública no combate de insetos vetores de agentes etiológicos e na agricultura. As substâncias deltametrina, permetrina e cipermetrina são alguns exemplos de piretróides utilizados (SANTOS *et al.*, 2007).

A alteração na suscetibilidade aos piretróides foi detectada em 2001 em algumas populações de *Aedes aegypti*, pouco tempo após este adulticida ser utilizado nos programas de controle do vetor (PEREIRA-DA-CUNHA *et al.*, 2005). Muitos trabalhos já detectaram resistência a este adulticida em diversos municípios brasileiros (DUQUE *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2011). A avaliação da susceptibilidade dos vetores aos piretróides envolve a distinção da resposta biológica dos adultos realizadas através de ensaios biológicos. E recentemente ensaios moleculares também são utilizados para detectar mutações, relacionadas à resistência, que ocorrem no sítio alvo de ação do inseticida.

Os piretróides atuam no canal sódio voltagem-dependente. Este canal é uma proteína transmembrana constituída por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um com seis segmentos transmembrana (S1-S6). A permeabilidade seletiva de íons de sódio através dos canais de sódio voltagem dependente é fundamental para a

geração de potenciais de ação em neurônios (YU & CATTERALL, 2003). Os inseticidas mantêm abertos os canais de sódio da membrana do axônio, estimulando as células nervosas a produzir sinais repetitivos causando a morte do inseto (BRAGA & VALLE, 2007a). Uma simples substituição de aminoácido neste canal pode estar associada com a resistência a piretróides, conhecida como resistência *knockdown* (*kdr*), ocorrendo uma redução da ligação do inseticida ao canal de sódio voltagem-dependente. Resistência *knockdown* é um termo genérico aplicado a insetos quando entram em contato com o inseticida e perdem a atividade coordenada momentaneamente recuperando após o efeito do mesmo (KAWADA *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2009). Os piretróides possuem semelhante mecanismo de ação do DDT e possivelmente este organoclorado tenha selecionado cepas resistentes do vetor também aos piretróides (resistência cruzada) (DAVIES *et al.*, 2008).

Muitas mutações no canal de sódio voltagem-dependente foram encontradas em diversos insetos e em *Aedes aegypti* (SODERLUND & KNIPPLE, 2003) associadas ou não com a resistência a piretróides. Brengues *et al.* (2003), descreveram sete mutações no segmento S6 hidrofóbico do domínio II em *A. aegypti* e encontraram uma das mutações (Ile1011Met) nas populações de *A. aegypti* de Belém no Pará. Lima *et al.* (2011), também encontraram esta mutação em três populações do Ceará: Juazeiro do Norte, Barbalha e Crato, sendo que neste último município a Ile1011Met foi associada com resistência a cipermetrina. Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007) encontraram mutações adicionais na mesma posição (Ile1011Met e Ile1011Val, Val1016Gly e Val1016Ile). A mutação Val1016Gly não foi encontrada nas populações de *A. aegypti* latino-americanas. Chang *et al.* (2009) encontraram uma nova mutação Asp1794Tyr em *A. aegypti* que concomitante com a mutação Val1016Gly podem exercer um efeito sinérgico na resistência a piretróides. Srisawat *et al.* (2010) detectaram em *A. aegypti* da Tailândia a mutação no códon 989 causada pela substituição de um T para C na primeira posição do códon, causando mudança do aminoácido de serina para prolina com alterações na polaridade do aminoácido. Como o aminoácido envolvido nesta mutação está localizado na matriz intracelular do canal de sódio voltage-dependente próximo ao filtro de seletividade iônica, a afinidade dos sítios de ligação para piretróides é provavelmente afetada. Yanola *et al.* (2010), detectaram uma mutação nas populações de *A. aegypti* da Tailândia, no códon 1552, resultando na substituição de

uma fenilalanina por cisteína no segmento 6 do domínio III. Os autores sugerem que a resistência a piretróides pode ser controlada por mais de um locus gênico.

A transição de uma adenina por uma guanina no alelo 1016 que leva a uma alteração de uma Valina por uma isoleucina (Val1016Ile) foi encontrada em populações de *Aedes aegypti* da América Latina por Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007), os autores sugerem que esta alteração pode estar fortemente associada à resistência a piretróides. Martins *et al.* (2009) detectaram a frequência da mutação Val1016Ile em muitas populações de *A. aegypti* brasileiras encontrando elevada frequência do genótipo homocigoto recessivo para a mutação Ile/Ile em Dourados (MT) e não detectaram o mesmo genótipo em Fortaleza e Maceió. Os genes que conferem resistência são recessivos e expressos em homocigose (DAVIES *et al.*, 2008). Este fato faz com que, sob forte pressão de seleção, os alelos da resistência sejam selecionados de maneira rápida, o que exerce forte influência na estrutura genética da população.

A detecção precoce da mutação *kdr* é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de manejo de inseticidas em populações de *Aedes aegypti* (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007)

1.3 Diversidade genética

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) é um culicídeo de origem africana que provavelmente foi trazido para o continente americano logo após a chegada dos europeus ao continente. No Brasil, após ser erradicado em 1955, foi reintroduzido na cidade de Salvador em 1976 (NOBRE *et al.*, 1994). O primeiro registro na literatura de *A. aegypti* no estado do Paraná data de 1985 a 1987 por Lopes *et al.* (1993), com encontro do vetor em apenas duas localidades do município de Londrina.

O estudo da estrutura genética da população é fundamental para a compreensão da dinâmica das populações de *Aedes aegypti* (HIRAGI *et al.*, 2009) presentes no Brasil, frente às diferentes formas de controle que o vetor vem sofrendo desde sua introdução no território brasileiro. Bracco *et al.* (2007), comentam que a variabilidade genética do *A. aegypti* nas Américas provavelmente tem sido reduzida devido à pressão seletiva resultante das ações do controle de vetores. Quando a população de mosquitos é reduzida, as novas populações

fundadas com poucos indivíduos podem apresentar mudanças genéticas, daquela original.

A variabilidade genética em populações naturais de *Aedes aegypti* tem sido investigada utilizando marcadores moleculares tais como RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (JULIO *et al.*, 2009), microssatélites (PAUPY *et al.*, 2010), SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único) (HEME *et al.*, 2010) e DNA mitocondrial (BIRUNGI & MUNSTERMANN, 2002).

Entre os marcadores utilizados, o DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado nas últimas três décadas. É uma molécula de dupla fita circular com 15 a 17 quilobases, apresenta 13 genes que codificam proteínas, dois genes de RNA ribossômico, 22 de RNA transportador e uma região não codificadora. Seus genes apresentam taxa de evolução rápida, tornando-se um marcador útil para estudar a genética populacional e variação intraespecífica. Muitas hipóteses foram geradas para explicar a alta taxa de mutação deste genoma, dentre elas estão o fato do DNA mitocondrial não possuir histonas, estar expostos a radicais livres da fosforilação oxidativa, não possuir mecanismos de reparo do DNA e ser duplicado muitas vezes nas linhagens celulares. O DNA mitocondrial é herdado maternalmente e raramente sofre recombinações. Este DNA não está livre de pressões seletivas uma vez que quase a totalidade do seu genoma codifica proteínas da fosforilação oxidativa (BALLARD & WHITLOCK, 2004; MARTINS & DOMINGUES, 2011).

Um das desvantagens da utilização do DNA mitocondrial em estudos populacionais e filogenéticos é a presença de pseudogenes, resultado da translocação de sequências mitocondriais do genoma mitocondrial para o genoma nuclear e uma vez integrado, essas sequências não-funcionais podem acumular mutações livremente. Os pseudogenes podem alterar os resultados de uma análise filogenética (HLAING *et al.*, 2009).

Dentre os genes mais utilizados no DNA mitocondrial, podemos citar o gene ND4 que codifica para a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4. Esta subunidade enzimática apresenta papel importante nas reações que produzem energia para célula. Supõe-se que a subunidade 4 faz parte da maquinaria de translocação de prótons nas reações de oxi-redução (FERREIRA *et al.*, 2008).

Muitos trabalhos utilizando análise filogenética de um fragmento do gene ND4, obtiveram fortes indícios de duas linhagens mitocondriais de *Aedes aegypti* presentes no Brasil. Bracco *et al.* (2007), utilizando o gene ND4 amplificaram 20 haplótipos distintos, sendo que 14 eram exclusivos das Américas, quatro da África e Ásia, um da África e América e um da Ásia e América. A análise dos haplótipos levou à formação de dois clados monofiléticos sugerindo a hipótese de duas linhagens mitocondriais de *A. aegypti* nas Américas. Uma delas foi introduzida no século XVII e XVIII pelo tráfico negreiro e outra mais recente introduzida por populações da Ásia devido às intensas trocas comerciais. Paduan e Ribolla (2008) analisando 12 populações de *A. aegypti* pertencentes a cinco Estados brasileiros indicaram a existência de duas linhagens mitocondriais diferentes. Estes autores encontraram na cidade portuária de Santos 10 haplótipos únicos que podem ainda não ter se espalhado pelo Brasil. Lima-Junior e Scarpassa *et al.* (2009) analisaram a variação genética das populações de *A. aegypti* da Amazônia brasileira e encontraram 13 haplótipos diferentes, sendo que a análise filogenética mostrou também duas linhagens na Amazônia brasileira, cada uma partilhando haplótipos com as populações da África Ocidental e da Ásia.

Muitos outros trabalhos analisaram o fragmento do gene mitocondrial ND4 em *Aedes aegypti*, em relação à diversidade genética das populações origem e dispersão: Bosio *et al.* (2005); Herrera *et al.* (2006); Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2002), Urdaneta-Marquez *et al.* (2008); Costa-da-Silva *et al.* (2005).

1.4 Justificativa

O uso contínuo de inseticidas em áreas com elevado número de casos de dengue durante os últimos anos podem selecionar os indivíduos de *Aedes aegypti* resistentes a inseticidas, prejudicando assim as ações de controle do vetor. Por isso a necessidade de investigar em termos de micro-regiões como a pressão de seleção de inseticidas pode estar afetando estas populações a nível molecular e biológico. Para piretróides já é conhecido os ensaios moleculares que detectam a presença da alteração no sítio alvo do inseticida, que está relacionado a resistência. Para temephos, muitas pesquisas a nível molecular estão sendo realizadas, mas até o momento os ensaios biológicos são uma alternativa para determinar a suscetibilidade das populações ao organofosforado.

Além disso, aliar estudos sobre variabilidade genética em populações que sofrem intensa pressão de seleção ocasionada por inseticidas é importante, principalmente em áreas estratégicas como o município de Foz do Iguaçu, localizado em área de tríplice fronteira com intenso comércio e fluxo de pessoas podendo ser uma localidade sensível para entrada de novas linhagens de *Aedes aegypti*.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o *status* de suscetibilidade de larvas e adultos a inseticidas químicos, a frequência da mutação Val1016Ile relacionada com a resistência a piretróides e a variabilidade genética do fragmento do gene mitocondrial ND4 em populações de *Aedes aegypti* do município Foz do Iguaçu, Paraná.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* de terceiro ínstar final e quarto ínstar inicial ao larvicida temephos, estimando as concentrações letais e razões de resistência 50 e 95, no município de Foz do Iguaçu.
2. Verificar a distribuição da mutação Val1016Ile relacionada com a resistência a piretróides e avaliar a suscetibilidade de *Aedes aegypti* a cipermetrina e deltametrina no município de Foz do Iguaçu.
3. Investigar a diversidade genética das populações de *Aedes aegypti* provenientes do município de Foz do Iguaçu, utilizando DNA mitocondrial.
4. Analisar a relação das linhagens mitocondriais encontradas com os alelos selvagem (1016Val) e mutante (1016Ile).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas no município de Foz do Iguaçu (-25° 32' 52" S e 54° 35' 17" W) no Estado do Paraná, Brasil. A cidade possui uma população estimada de 256.088 habitantes e 617.702 km² de área, está localizado no extremo oeste do Estado, faz fronteira com Puerto Iguaçu, na Argentina e Ciudad del Este no Paraguai (IBGE, 2011).

3.2 Procedimentos de coleta

Conforme o método de Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *Aedes aegypti* (LIRAA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005), Foz do Iguaçu enquadra-se nos municípios de grande porte, com mais de 8100 imóveis, por isso a divisão geográfica do município foi feita em 11 estratos cada qual com no mínimo 8100 imóveis (Figura 1). As coletas foram realizadas pela equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ), utilizando armadilhas ovitrampas (FAY & ELIASON, 1966). A armadilha consiste em um vaso preto de plástico com capacidade para 500 ml com água de torneira e uma paleta de Eucatex de 2 cm de largura por 12 cm de comprimento presa com um clipe no suporte plástico preto. As fêmeas de *A. aegypti* colocam seus ovos na parte rugosa da paleta.

Para este estudo foram realizadas quatro coletas: 8 a 12 de dezembro de 2008; 13 a 17 de fevereiro de 2009, 22 a 26 de maio de 2009, 23 a 27 de outubro de 2009. Foram instaladas 15 armadilhas por estrato, totalizando 165 armadilhas. As armadilhas eram instaladas de forma aleatória dentro das localidades do estrato. Permaneciam no campo durante cinco dias, eram instaladas na segunda-feira e retiradas na sexta-feira. As paletas eram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e guardadas em caixas de papelão para serem enviadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária/UFPR/Curitiba.

3.3 Procedimentos em laboratório

Em laboratório os ovos eram quantificados sob microscópio estereoscópico. Todo processo de criação foi realizado em condições similares de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($80\pm 10\%$) e fotoperíodo (12h: 12h), ideais para a espécie no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária do Departamento de Zoologia da UFPR. Para induzir a eclosão, as paletas com ovos eram submersas em copos plásticos de 770 ml contendo água desclorada e ração de gatos triturada (Purina® Cat Chow ®), por 48 horas. Após, eram retiradas as larvas e descartada a água. As paletas eram novamente submersas em água por mais 48 horas com alimento, para maximizar a eclosão das larvas. As larvas eram transferidas e mantidas em copos com tampa até a emergência do adulto. Os adultos eram triados por estratos e espécie.

Para a realização dos bioensaios com temephos, os adultos emergidos das ovitrampas da coleta realizada em dezembro/2008 eram alimentados com mel a 10%. Três dias após a emergência das últimas pupas, eram fornecidos camundongos Swiss, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná (Número do comitê de ética em pesquisa: 227), para a realização do repasto sanguíneo. Recipientes de vidro com água e papel filtro umedecido eram colocados dentro de vasos pretos como substrato de oviposição das fêmeas. Os ovos eram colocados para eclosão em copos de 770 ml, após 24h as larvas eram transferidas para banjejas com água e alimento e permaneciam por quatro dias. Quando as larvas já se encontravam em terceiro ínstar final e quarto ínstar inicial eram separadas para realização dos bioensaios. Para os bioensaios os estratos um, dois e quatro foram unidos na região denominada de Norte; os estratos cinco, seis e sete na região Central e os estratos nove, dez e onze na região Sul (Figura 2). Os estratos três e oito foram excluídos da análise da suscetibilidade ao temephos devido à ausência de ovos para os bioensaios.

Para as análises da mutação Val1016Ile, *Aedes aegypti* recém-emergidos foram amostrados em cada um dos onze estratos e dos quatro períodos de coleta (dez/2008; fev/2009, maio/2009 e out/2009).

Para as análises do fragmento do gene mitocondrial ND4 foram selecionados 10 indivíduos de cada estrato nos diferentes períodos de coleta. Nos estratos que apresentaram linhagens mitocondriais diferentes, mais dez indivíduos foram analisados. Os indivíduos foram acondicionados individualmente em etanol absoluto e mantidos a -20°C .

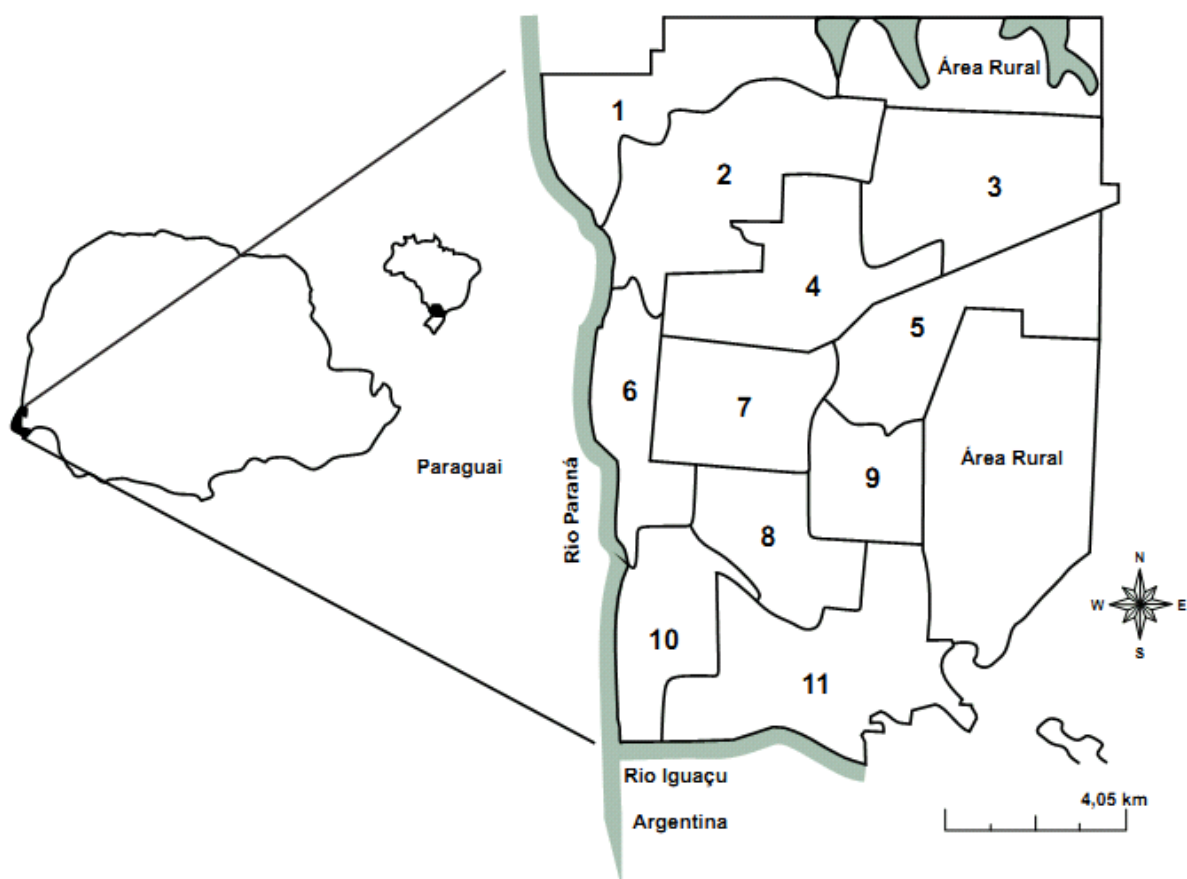


Figura 1. Município de Foz do Iguaçu, apresentando a divisão em 11 estratos, localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, região Sul do Brasil.

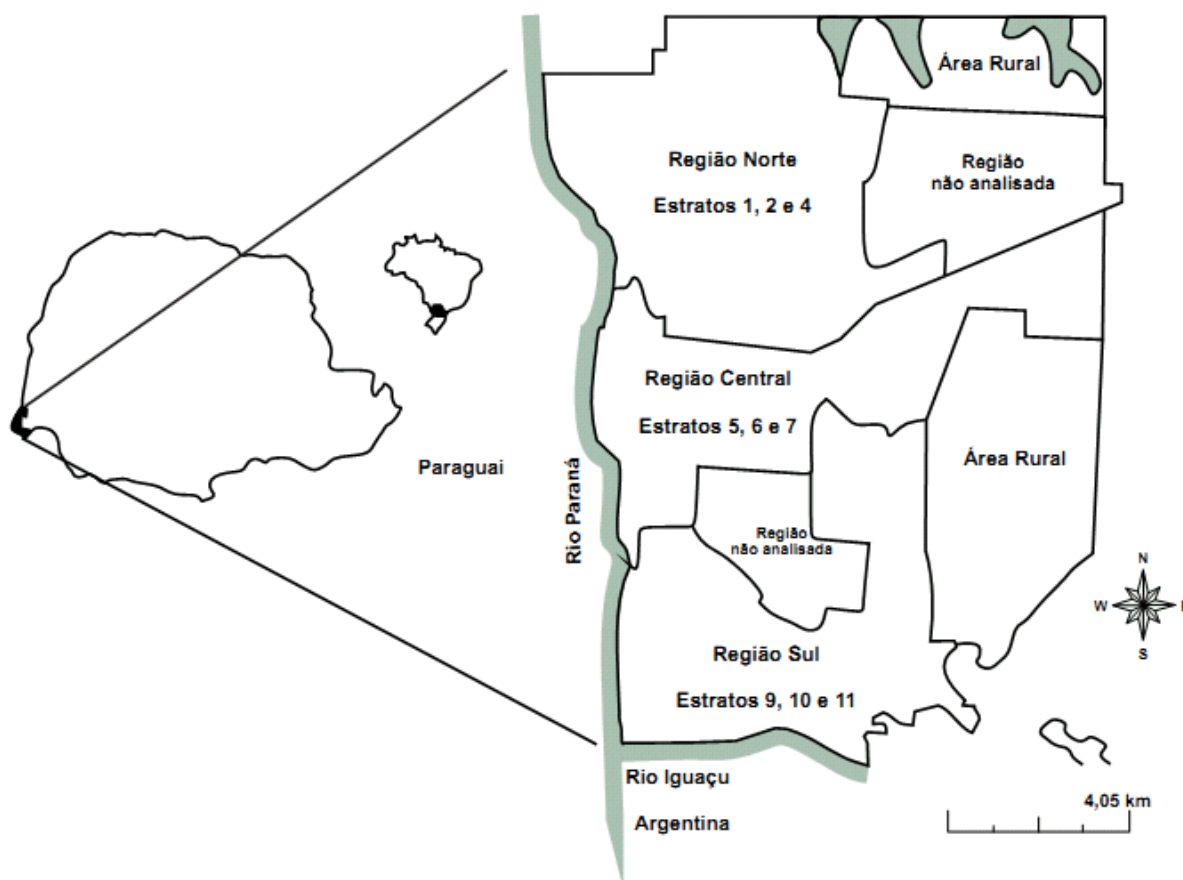


Figura 2. Município de Foz do Iguaçu, dividido em regiões Norte, Central e Sul, localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, Brasil.

3.3.1 Bioensaios da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos

O inseticida utilizado foi o temephos pestanal ($C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$) 250 mg a 97,5% (Sigma). Para sua preparação foi adicionado 100 μ L de acetona gelada a 243,75 mg do inseticida, completando para o volume final de 1 ml com etanol. Foram realizadas alíquotas de 61,5 μ L de todo o inseticida. Cada alíquota (solução estoque) era completada para 5 ml com etanol (concentração final de 3000 ppm). A solução de uso foi de 6 ppm. A calibração deste inseticida foi realizada com a linhagem suscetível, *Aedes aegypti* cepa Rockefeller. (Centers of Disease Control, CDC).

3.3.1.1 Bioensaio com temephos: Concentração diagnóstica

A concentração diagnóstica equivale ao dobro da concentração letal que mata 99% das larvas. A concentração letal que mata 99% (CL99) das larvas da cepa suscetível é 0,0081 ppm. A concentração diagnóstica (CD) 0,0162 ppm foi inserida no bioensaio com concentrações múltiplas. A leitura da concentração diagnóstica foi realizada após 24 horas, calculando-se a taxa de mortalidade das larvas. Populações com porcentagem de mortalidade acima de 98% foram consideradas suscetíveis, entre 80% e 98% com alteração da suscetibilidade e abaixo de 80% resistentes (WHO, 1998).

3.3.1.2 Bioensaio com temephos: Concentrações múltiplas

Os bioensaios seguiram o procedimento proposto pela Organização Mundial da Saúde para avaliar a suscetibilidade das larvas ao temephos (WHO, 1981a). Foram realizados quatro experimentos em quatro dias diferentes. Em cada experimento foram testadas nove concentrações com quatro réplicas. Cada concentração com 20 larvas, de terceiro instar final e quarto instar inicial de *Aedes aegypti*, totalizando 720 larvas por experimento. Em todos os copos foram adicionados 80 ml de água filtrada e 20 ml de água que continha as larvas. Como controle externo a população testada, foram utilizados quatro réplicas com solvente etanol (Figura 3). A leitura dos testes foi realizada após 24 horas, calculando-se a taxa de mortalidade das larvas.

As concentrações letais foram calculadas no programa Probit basic (FINNEY, 1971). As razões de resistência 50 e 95 foram calculadas dividindo a concentração letal (50 ou 95) da população analisada pela concentração letal (50 ou 95) da população Rockefeller.

Para testar a estabilidade do temephos, foi realizado um bioensaio com a cepa Rockefeller. Foram preparados dez copos: quatro réplicas com a concentração letal que mata 99% das larvas, quatro réplicas com metade dessa concentração (1/2 CL99) e duas réplicas com o solvente etanol (Figura 4).

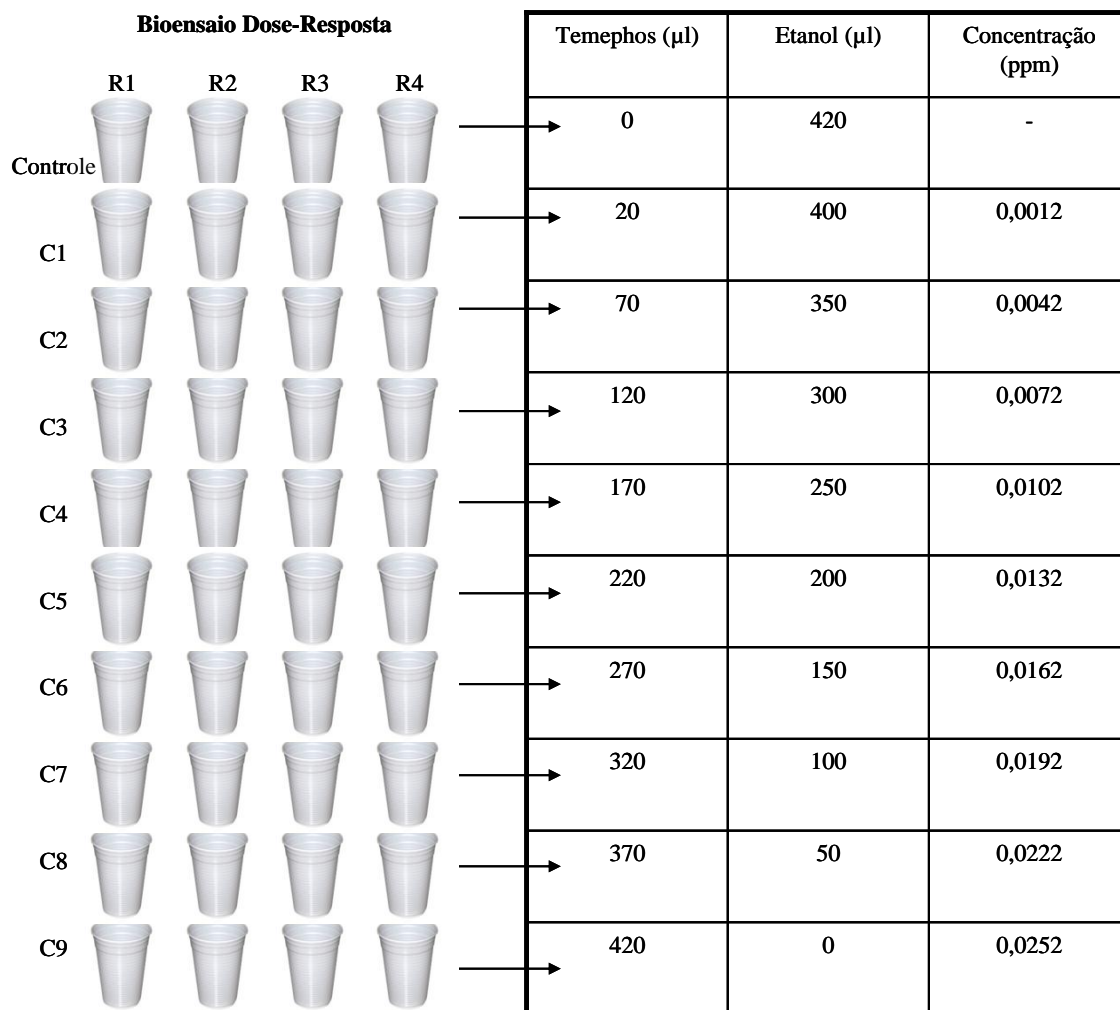


FIGURA 3. Esquema do procedimento do bioensaio de temephos com concentrações múltiplas (C1 a C9) e concentração diagnóstica (C6: 0.0162 ppm), totalizando quatro réplicas (R1 a R4), em quatro dias diferentes, mantido em câmara BOD a 26°C.

CONTROLE INTERNO COM ROCKEFELLER

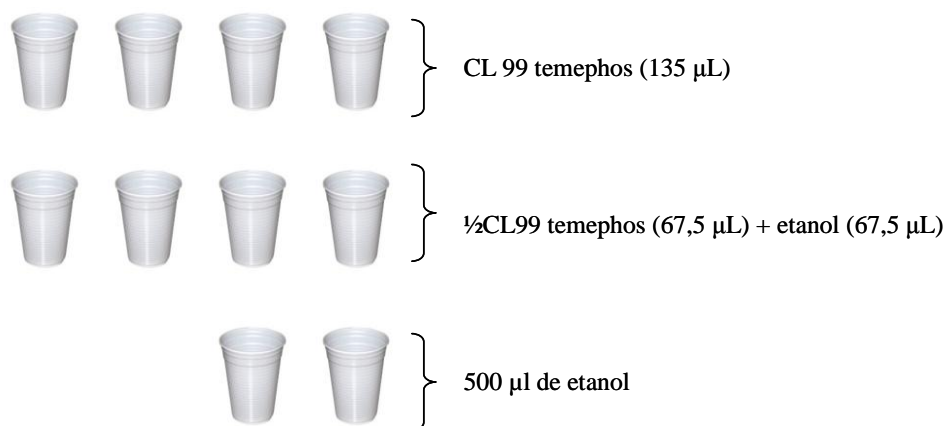


Figura 4. Esquema do procedimento de controle de estabilidade do temephos com a população suscetível Rockefeller, com duas concentrações de temephos e um controle com etanol, mantido em câmara BOD a 26°C.

3.3.2 Bioensaios da suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos piretróides: Concentração diagnóstica

Os mosquitos foram coletados na programação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* (MoReNAa) (BRAGA & VALLE, 2007b) no município de Foz do Iguaçu de 24 de novembro a 12 de dezembro de 2008. Todos os procedimentos de criação de *Aedes aegypti* e dos bioensaios foram realizados no Núcleo de Avaliação e Pesquisa do Serviço Regional de Marília da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN, Marília/SP), coordenado pela Dra. Maria de Lourdes da Graça Macoris. Foram realizados bioensaios qualitativos com utilização da concentração diagnóstica (CD) em ensaios com papéis impregnados com cipermetrina (CD: 146mg i.a./m²) e deltametrina (CD: 18 mg i.a./m²) (WHO 1981 b,c, 1992, 1998). A leitura da concentração diagnóstica foi realizada após 24 horas, calculando-se a taxa de mortalidade dos adultos. Populações com porcentagem de mortalidade acima de 98% foram consideradas suscetíveis, entre 80% e 98% com alteração da suscetibilidade e abaixo de 80% resistentes (WHO, 1998).

3.3.3 Extração de DNA para análise dos fragmentos dos genes canal de sódio voltagem-dependente e ND4.

Na extração do DNA total foi utilizado o protocolo de Cheung *et al.* (1993) modificado. Cada mosquito adulto previamente congelado em álcool foi individualizado em tubo eppendorf de 1,5 ml. Em cada tubo foram adicionados 160 µL do tampão de lise (TrisHCl 0,5 M, NaCl 4 M, EDTA 0,5 M). Os mosquitos foram macerados em homogeneizador. Após, foi adicionado 20 µL de SDS 10% para lisar as células. Os tubos foram incubados em banho sorológico durante 30 minutos a 60°C. Para desproteinização foram adicionados em cada tubo 50 µL de clorofórmio e álcool isoamílico e após as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm, em centrifuga refrigerada a 15 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml já identificado e adicionado 80 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 300 µL de etanol 96%. As amostras foram homogeneizadas por inversão e levadas ao congelador a -20°C por 30 minutos para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 13.000 rpm a 15 °C. Após a centrifugação, foi

descartado o sobrenadante e adicionado 300 μ L de álcool 70% para lavar o DNA. Novamente as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 13.000 rpm a 15 °C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perder o *pellet*. Os tubos foram colocados na estufa a 37 °C para secar as amostras. O DNA foi ressuscitado em 50 μ L de TE 1X (TrisHCl 0,5 M, EDTA 0,05 M e Água MilliQ) e armazenado a -20°C. A quantificação do DNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop® .

3.3.4 Amplificação gênica alelo específica do fragmento do gene canal de sódio voltagem-dependente (códon 1016).

Para avaliar a presença da mutação Val1016Ile foi realizado um PCR alelo-específico, utilizando três iniciadores (IDT, Coralville, IA, USA): um específico para o aminoácido Val (5'- GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG -3'), um específico para aminoácido Ile (5'- GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A -3'), e o terceiro comum aos dois aminoácidos (5'- GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C -3') (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009).

As reações de PCR foram conduzidas contendo 2,5 μ L de tampão 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 12,5 pMoles de cada iniciador, dNTP 200 μ M (Amresco, Solon, OH), 100 ng de DNA, 2U de Taq DNA Polimerase (Sigma-Aldrich), completando para o volume de final de 25 μ L com água MilliQ. As reações foram seguidas de acordo com Saavedra Rodriguez *et al.* (2007), foram utilizados os seguintes parâmetros de temperatura: desnaturação inicial a 95°C por 12 minutos, 39 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos; seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos e um incremento de 65°C para 95°C numa taxa de 0,3°C/s. A verificação dos alelos amplificados foram realizadas em gel de poliacrilamida 9% com a aplicação de uma alíquota de 4 μ L da amostra. Bandas de 78 e 98 pb correspondem, respectivamente aos alelos mutante (1016Ile) e selvagem (1016Val) (Figura 5).

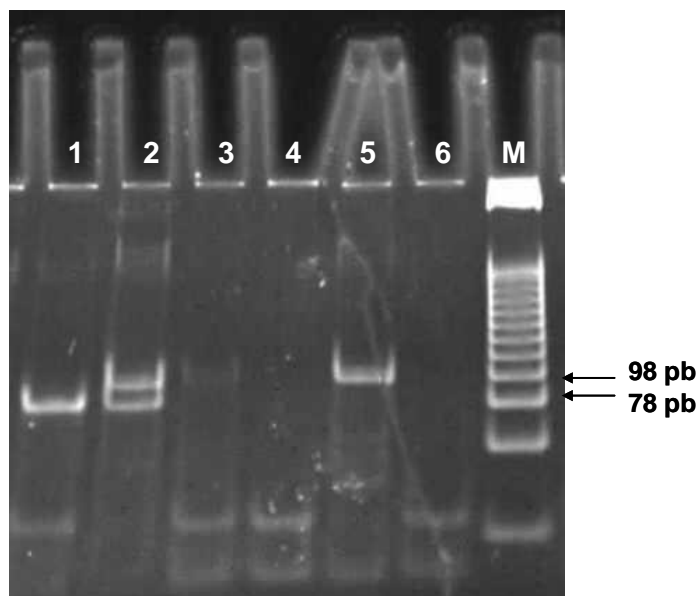


Figura 5. Amplificados obtidos através da PCR alelo-específica. 1: Indivíduo homocigoto recessivo para o alelo mutante (Ile/Ile), 2: Indivíduo heterocigoto (Val/Ile), 3 e 4: Amostras não amplificadas, 5: Indivíduo homocigoto dominante para o alelo selvagem (Val/Val), 6: Amostras não amplificadas, M: Marcador molecular de 25 pb (Promega, Madison, WI).

3.3.4.1 Cálculos das frequências alélicas e genotípicas

A frequência genotípica $f(x)$ representa a porcentagem de ocorrência de determinado genótipo ($x = \text{Val/Val}$, Val/Ile ou Ile/Ile) em relação ao número total de indivíduos observados dentro de uma população. Foi calculada utilizando a fórmula abaixo:

$$F(x) = \frac{\text{Número de indivíduos com o genótipo } x}{\text{Número total indivíduos}}$$

A frequência alélica $f(y)$ representa a porcentagem de ocorrência de determinado alelo ($y = \text{Val}$ ou Ile) em relação ao número total de alelos observados dentro de uma população. Foi calculada utilizando a fórmula abaixo:

$$F(\text{Val}) = \frac{2 \times \text{Número de indivíduos com o genótipo Val/Val} + \text{Número de indivíduos com o genótipo Val/Ile}}{2 \times \text{Número total indivíduos}}$$

$$F(\text{Ile}) = \frac{2 \times \text{Número de indivíduos com o genótipo Ile/Ile} + \text{Número de indivíduos com o genótipo Val/Ile}}{2 \times \text{Número total indivíduos}}$$

Os valores preditivos das frequências alélicas, de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg, são: Val/Val = p^2 ; Val/Ile = $2pq$; Ile/Ile = q^2 , onde p = é a frequência de Val e q é a frequência de Ile (HARTL, 2008).

Foram analisadas as variáveis: genótipos e alelos, por meio da análise de variância de um fator (ANOVA), testando as duas premissas: homogeneidade das variâncias e distribuição normal dos dados. Quando necessário os dados foram transformados em logaritmo base 10. Para diferenças significativas ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o programa Bioestat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007). As comparações de proporções aos pares dos genótipos heterozigotos e homozigotos recessivos seguiram Zar (2010).

3.3.5 Amplificação do fragmento do gene ND4

A amplificação do segmento de 336 pb do gene que expressa a subunidade 4 da enzima mitocondrial NADH desidrogenase foi realizada utilizando 20 ng de DNA, 12,5 pMoles de cada iniciador (IDT, Coralville, IA, USA), dNTP 200 μ M (Amresco, Solon, OH), 2,5 μ L de Tampão 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$), 1 U Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich), e água Milli-Q para um volume final de 25 μ L.

Os iniciadores utilizados na amplificação foram: iniciador universal: 5'-ATT GCC TAA GGC TCA TGT AG-3' e iniciador reverso: 5'-TCG GCT TCC TAG TCG TTC AT-3'. As amostras foram amplificadas com os seguintes parâmetros: desnaturação, um ciclo de 94°C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e um ciclo de alongação final de 72°C por 7 minutos (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2005). O sucesso da amplificação foi verificado submentendo alíquotas de 6 μ L da amostra a eletroforese em gel de agarose 1,5%. O amplificado corresponde a 336 pb localizados nas posições 8405 a 8741 no genoma mitocondrial de *A. aegypti* (Figura 6).

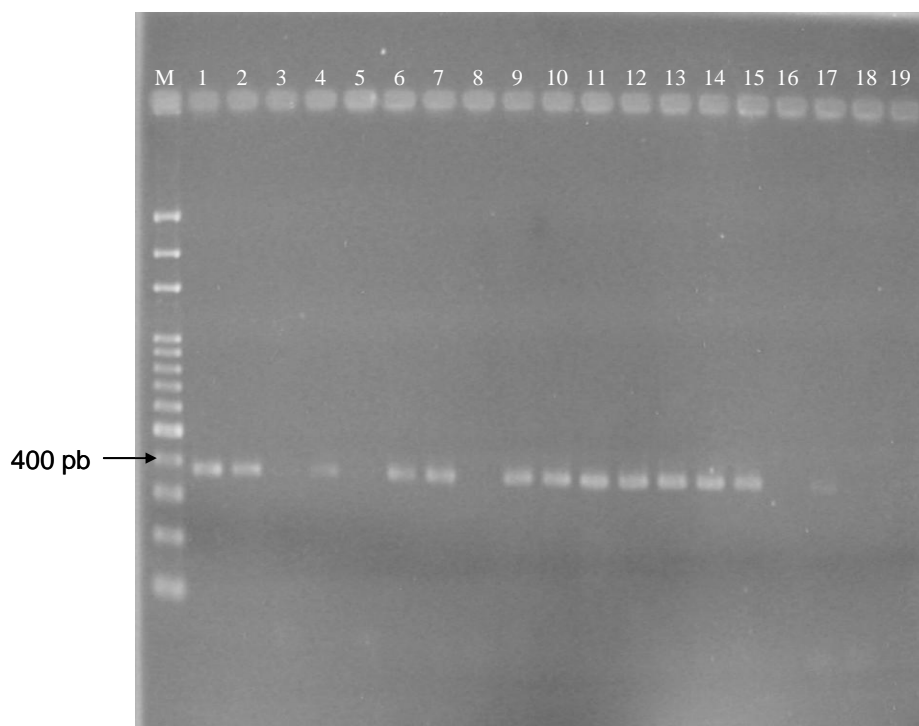


Figura 6. M: Marcador molecular de 100 pb (Amresco, Sólón, Ohio). Produtos de amplificação do fragmento do gene ND4 de 13 indivíduos de *Aedes aegypti* (1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17) com tamanho aproximado de 336 pares de base (pb). 3, 5, 8, 16, 18 e 19: Amostras não amplificadas.

3.3.5.1 Purificação e sequenciamento do fragmento do gene ND4

A reação de purificação do produto amplificado foi feita com o kit Qiaquick® PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), segundo instruções do fabricante. Foram sequenciadas duas seqüências de cada indivíduo, as amostras foram encaminhadas para Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo) para sequenciamento utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

3.3.5.2 Análises das seqüências do fragmento do gene ND4

As seqüências de consenso foram obtidas no Staden Package version 1.5, o alinhamento foi realizado no BioEdit version 7.0.0 (HALL, 2004), ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). As seqüências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta tblastx para confirmação do fragmento amplificado. A diversidade genética e os testes de neutralidade (D de Tajima, F^* e D^* de seletividade neutra e F_s de F_u) foram calculados no programa

DnaSP, versão 5 (LIBRADO & ROZAS, 2009). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada através do programa Arlequin version 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). O número de migrantes por gerações (Nm) foi obtido utilizando a fórmula $F_{st} = 1 / (2Nm + 1)$ (F_{st} = índice de fixação), considerando organismos haplóides. As distâncias geográficas foram obtidas através de cálculos realizados no programa Google Earth 6.

4. RESULTADOS

4.1 Bioensaios da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos

4.1.1 Bioensaio com temephos: Concentração diagnóstica

As populações de *Aedes aegypti* da região Central e Sul de Foz do Iguaçu foram consideradas resistentes ao temephos. A população da região Norte apresentou alteração no *status* de suscetibilidade ao organofosforado, de acordo com a concentração diagnóstica de 0,0162 ppm (Tabela II).

Tabela II. Bioensaios com a concentração diagnóstica 0,0162 ppm (calibrada com a cepa Rockefeller) em larvas de *Aedes aegypti* provenientes de três regiões do municípios de Foz do Iguaçu Paraná em 2008.

Região	% Mortalidade	Status de suscetibilidade
Rockefeller	100	Suscetível
Norte	85	Alteração da suscetibilidade
Central	71	Resistente
Sul	77	Resistente

4.1.2 Bioensaio com temephos: Concentrações múltiplas

As populações de *Aedes aegypti* da região Norte, Central e Sul apresentaram razões de resistência 95 maior que três. De acordo com os valores do *slope*, em todos os casos a heterogeneidade das populações foi maior que na cepa Rockefeller (Tabela III).

Tabela III. Geração da população, qui-quadrado, *slope*, concentrações letais, razões de resistência das larvas de *Aedes aegypti* para temephos em três regiões no município de Foz do Iguaçu, utilizando como controle a cepa Rockefeller.

	Geração	X²	Slope	CL50 (95% IC)	CL95	CL99	RR50	RR95
Rockefeller	Fn	7,3735	6,1402	0,0034	0,0063	0,0081	x	x
			(±0,2505)	(0,0033<CL<0,0035)	(0,0063<CL<0,0067)	(0,0076<CL<0,0088)		
Norte	F1	5,1269	3,7114	0,0086	0,0239	0,0364	2,5294	3,7937
			(± 0,2140)	(0,0080<CL<0,0091)	(0,0221<CL<0,0262)	(0,0325<CL<0,0419)		
Central	F1	8,6976	4,9158	0,0118	0,0256	0,0352	3,4706	4,0635
			(± 0,2386)	(0,0113<CL<0,0123)	(0,0241<CL<0,0274)	(0,0324<CL<0,0388)		
Sul	F1	1,9744	3,6267	0,0103	0,0293	0,0451	3,0294	4,6508
			(± 0,1533)	(0,0098<CL<0,0108)	(0,0271<CL<0,0320)	(0,0406<CL<0,0511)		

4.2 Bioensaios da suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos piretróides: Concentração diagnóstica

Em 2008 a população de *Aedes aegypti* do município de Foz do Iguaçu mostrou-se resistente aos piretróides, de acordo com concentração diagnóstica de 146 mg i.a./m² para cipermetrina e 18 mg i.a./m² para deltametrina ((Tabela IV).

Tabela IV. Bioensaios com a concentração diagnóstica de cipermetrina (146 mg i.a./m²) e deltametrina (18 mg i.a./m²) para adultos de *Aedes aegypti* provenientes do municípios de Foz do Iguaçu Paraná em 2008.

Piretróide	* % Mortalidade	Status de suscetibilidade
Cipermetrina	72,2	Resistente
Deltrametrina	57,0	Resistente

* Dados obtidos da Sucen/SP

4.3 Genotipagem do códon 1016 do fragmento do gene canal de sódio voltagem-dependente

Um total de 234 exemplares de *Aedes aegypti* foram analisados para a mutação Val1016Ile. Destes, 15% (35) eram homozigotos dominantes para o alelo selvagem (Val/Val); 62% (146) heterozigotos (Val/Ile) e 23% (53) homozigotos recessivos para o alelo mutante (Ile/Ile). A freqüência do genótipo Val/Ile foi mais elevada que dos genótipos Val/Val e Ile/Ile ($p=0,0002$; $F=12,7356$; $GL=2$). As freqüências de genótipos que apresentavam o alelo recessivo não foram distribuídas aleatoriamente nos 11 estratos (Val/Ile: $X^2 = 28,54$; Ile/Ile: $X^2 = 28,16$ valor crítico 18,30 para dez graus de liberdade) (Tabela V).

Tabela V. Número de indivíduos analisados e frequências genotípicas para mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de *Aedes aegypti*, coletados em 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, durante quatro períodos diferentes.

Estratos	Frequência Genotípica			Total
	Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile	
1	0,13	0,47	0,40	15
2	0,14	0,79	0,07	29
3	0,17	0,28	0,55	18
4	0,05	0,80	0,15	20
5	0,11	0,72	0,17	18
6	0,12	0,59	0,29	17
7	0,05	0,58	0,37	19
8	0,00	0,65	0,35	20
9	0,43	0,50	0,07	14
10	0,03	0,80	0,17	36
11	0,46	0,43	0,11	28

* A população está em equilíbrio de Hardy–Weinberg.

A frequência alélica total foi de 0,46 para o alelo Val e 0,54 para o alelo Ile. Não foi detectada diferença significativa nas frequências dos alelos 1016Val e 1016Ile ($p= 0,109$; $F=2,757$; $GL=1$) nos 11 estratos analisados dentro do município. Todos os estratos apresentaram maior frequência do alelo mutante, que confere resistência quando em homozigose, exceto os estratos 2, 9 e 11 (Figura 7).

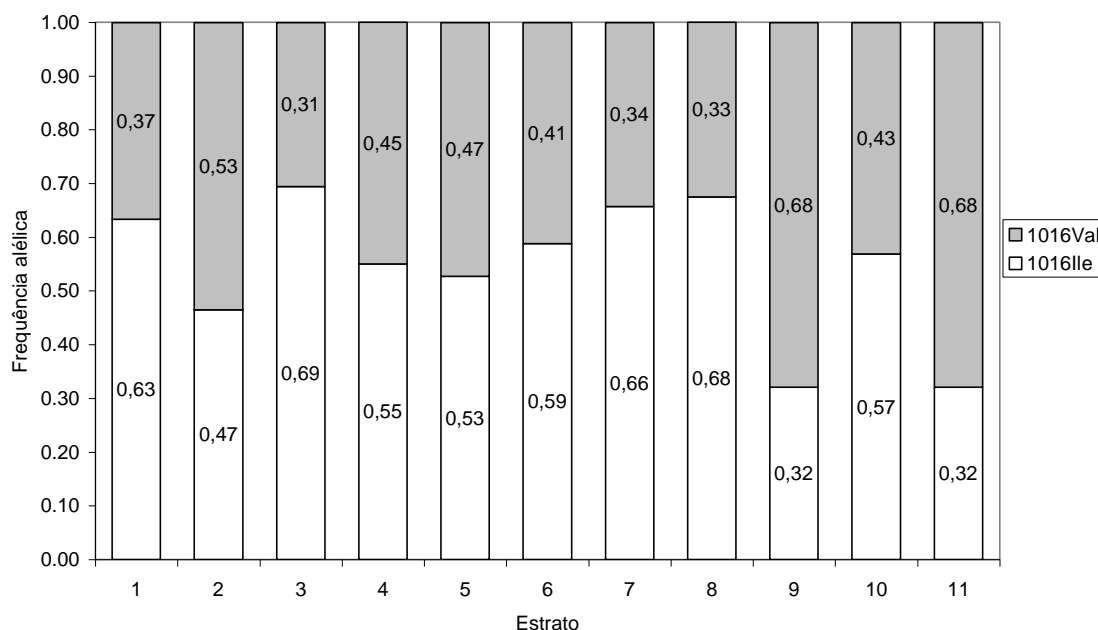


Figura 7. Frequências dos alelos selvagem (1016Val) e mutante (1016Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de *Aedes aegypti* nos 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.

4.4 Fragmento do gene mitocondrial ND4

O fragmento amplificado do gene ND4 possuía 336 pb, entretanto somente 291 pb foram usados para as análises. A análise do fragmento amplificado de 157 indivíduos mostrou a existência de 11 sítios polimórficos e 280 sítios monomórficos. Foram encontrados dois haplótipos na população de Foz do Iguaçu, H1 (93%) (GenBank: JN190355) e H2 (7%) (Genbank: JN190356). Os haplótipos foram distinguidos por dez transições: G↔A (sítios 039, 219); T↔C (sítios 069, 084, 201); A↔G (sítios 117; 162, 210, 219); C↔T (sítio 240), e uma transversão: A↔T (sítio 081) (Tabela VI).

O número de diversidade haplotípica encontrado foi $Hd = 0,131 \pm 0,035$, diversidade nucleotídica foi $\pi = 0,00475 \pm 0,00127$ e o número médio de diferenças nucleotídicas foi $k = 1,311$. Os testes de seletividade neutra aplicados não foram significativos ($p > 0,05$), as populações estão de acordo com as premissas do modelo neutro de mutações: Teste D de Tajima: -0,62896; Teste D de Fu e Li: 1,34621; Teste F de Fu e Li: 0,76017; Fs de Fu: 6,470.

Em quatro indivíduos analisados foram encontradas heteroplasmias, fenômeno este que se caracteriza pela presença em um mesmo indivíduo de mais um genótipo de DNA mitocondrial (Tabela VII).

Para a análise da variância molecular as populações foram agrupadas de acordo com os estratos. Os resultados mostraram que quase toda a variação (99,78%) encontrada ocorreu dentro das populações, enquanto 0,22% da variação ocorreu entre as populações, com um valor de $F_{st} = 0,00217$ não significativo ($p=0,4164$) (Tabela VIII). O fluxo gênico para a população total foi de $Nm = 230$. Nas comparações par a par entre os estratos, todos os valores de F_{st} não foram significativos (Tabela IX).

Tabela VI. Número de indivíduos de cada haplótipo de *Aedes aegypti*, coletados em 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, durante quatro períodos diferentes.

Haplótipos	Estratos											Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
H1	10	10	18	16	10	18	16	10	10	18	10	146
H2	0	0	2	4	0	1	2	0	0	2	0	11

Tabela VII. Posição das heteroplasmias encontradas nas sequências de *Aedes aegypti*.

Haplótipos	Posição da heteroplasmia				
	0	0	1	1	2
	6	8	1	6	0
	9	4	7	2	1
H1		Y			Y
H2	Y	Y			Y
H2		Y			
H2	Y	Y	R	R	Y

* Y= C ou T
R= A ou G

Tabela VIII. Análise de variância molecular (AMOVA) de *Aedes aegypti* considerando como grupos os 11 estratos do município de Foz do Iguaçu.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação	Índice de fixação
Entre populações	10,00000	12,81200	0,00270	0,22000	$F_{st}=0,00217$
Dentro das populações	146,00000	181,50000	1,24320	99,78000	
Total	156,00000	194,31200	1,24590	100,00000	

Tabela IX. Fluxo gênico (distancia geográfica em km) (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) entre amostras de *Aedes aegypti* de 11 estratos do município de Foz do Iguaçu, Paraná.

Strata	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0,000	inf (2,10)	inf (7,64)	5,55 (5,48)	inf (6,00)	10,23 (6,85)	18,63 (8,09)	7,38 (10,42)	inf (9,95)	13,56 (12,68)	4 (13,94)
2	0,000	0,000	inf (6,41)	6,5 (3,23)	inf (6,17)	inf (5,64)	inf (5,42)	inf (8,40)	inf (7,69)	inf (10,27)	inf (11,75)
3	0,008	0,016	0,000	inf (4,55)	inf (2,16)	428 (9,47)	inf (7,42)	19,47 (9,12)	inf (7,11)	inf (12,10)	23,68 (11,49)
4	0,083	0,071	0,026	0,000	6,5 (4,00)	7,87 (4,59)	inf (3,13)	4,83 (5,86)	5,55 (4,53)	287 (8,10)	4,42 (8,70)
5	0,000	0,098	0,018	0,071	0,000	inf (8,07)	inf (5,96)	inf (7,19)	inf (4,88)	inf (10,37)	inf (9,35)
6	0,047	0,026	0,001	0,060	0,033	0,000	inf (2,36)	inf (4,48)	10,23 (5,56)	inf (5,37)	inf (7,98)
7	0,026	0,019	0,036	0,018	0,021	0,029	0,000	inf (3,17)	18,61 (3,17)	inf (5,20)	inf (6,30)
8	0,063	0,011	0,025	0,094	0,028	0,024	0,009	0,000	7,38 (2,41)	inf (3,12)	inf (3,37)
9	0,000	0,000	0,008	0,083	0,000	0,047	0,026	0,063	0,000	13,56 (5,35)	4 (4,42)
10	0,036	0,013	0,021	0,002	0,018	0,040	0,050	0,017	0,036	0,000	inf (4,13)
11	0,111	0,019	0,021	0,102	0,044	0,051	0,021	0,076	0,111	0,032	0,000

* Inf.: Infinito; Número de permutações = 1023

4.5 Correlação entre diversidade genética e o alelo da mutação 1016Ile

Foram analisados 79 indivíduos concomitantemente para o fragmento ND4 e para mutação 1016Ile, 73 indivíduos do haplótipo H1 e seis do haplótipo H2. Ambos os alelos 1016Val e 1016Ile foram observados nos indivíduos com os haplótipos H1 e H2 (Figura 8).

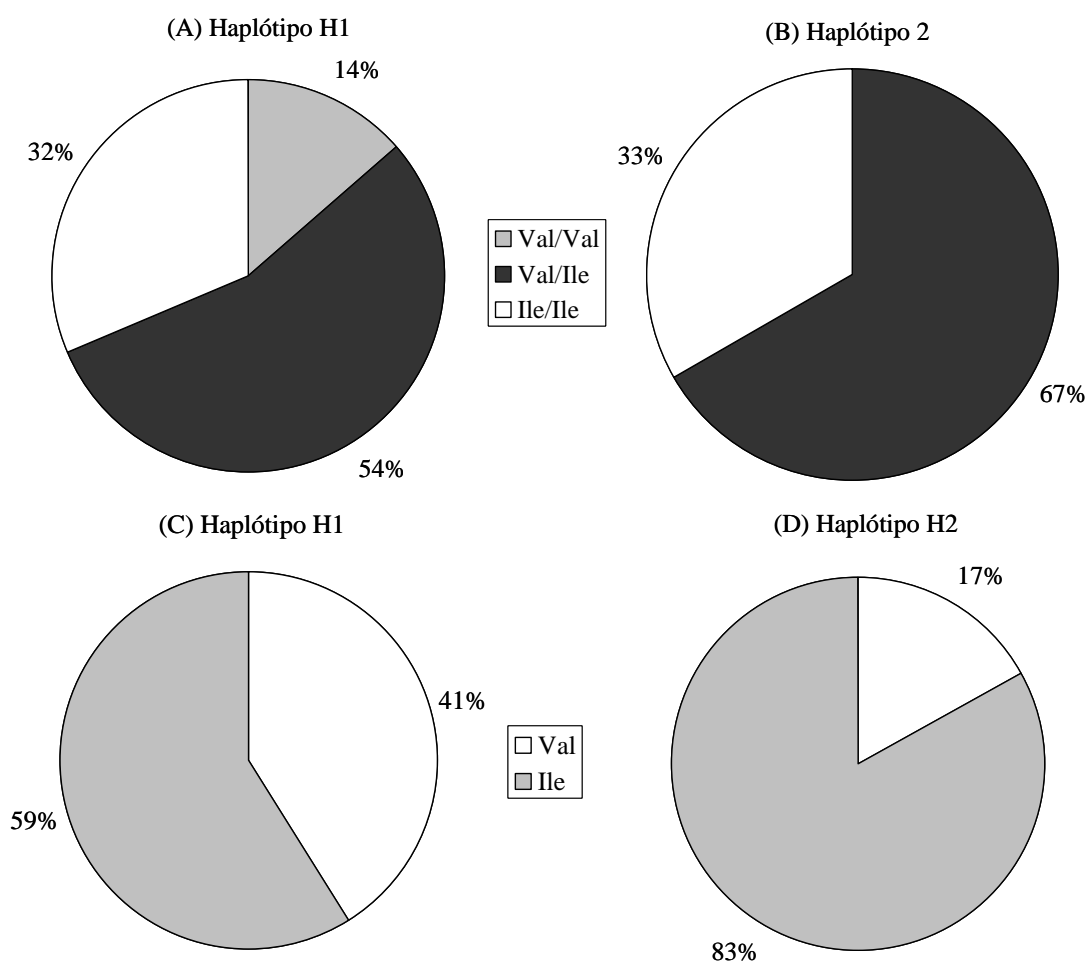


Figura 8. Porcentagem de genótipos homocigotos recessivos, dominantes e heterocigotos em relação aos haplótipos H1 (A); H2 (B) de *Aedes aegypti*. Porcentagem dos alelos recessivos e dominantes em relação aos haplótipos H1 (C); H2 (D) de *Aedes aegypti*.

5 DISCUSSÃO

Foz do Iguaçu é um pólo de atração turística e comercial, com elevado casos de dengue nos últimos anos (DUQUE *et al.*, 2010). Nesta área, inseticidas químicos são utilizados para controlar o vetor, principalmente em períodos epidêmicos, causando a seleção contínua de insetos resistentes a inseticidas.

A resistência das larvas ao inseticida temephos em Foz do Iguaçu já tinha sido relatada por outros autores. Duque (2008) encontraram para *Aedes aegypti* em 2005, 67,5% de mortalidade (CD: 0,0060) e razão de resistência (RR95) de 3,9. Prophiro *et al.* (2011) em 2006/2007 dividiram o município em duas regiões, encontraram mortalidade de 77,5% (CD: 0,0060) para região Sul (RR95: 3,62) e 75,94% de mortalidade para região Norte (RR95: 3,13). No presente trabalho a razão de resistência 95, já esta elevada em relação aos estudos anteriores chegando a 4,6 na região Sul de Foz do Iguaçu.

Segundo Mazzari e Georghiou (1995), os níveis de resistência eram definidos como: razão de resistência (RR) < 5 o *status* era considerado baixo, entre 5 e 10 considerado médio e elevado acima de 10. Em 2006 na reunião técnica da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* (MoReNAa), ficou determinado que municípios com razão de resistência maior que 3 deveriam realizar o manejo do inseticida para outro com mecanismo de ação diferente, com intuito de reduzir a pressão de seleção das populações expostas aquele inseticida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em 2011, Foz do Iguaçu inicia a utilização do regulador de desenvolvimento do inseto diflubenzuron, larvicida que interfere na síntese de quitina, substância esta que forma o exoesqueleto dos insetos. Apesar disso, o monitoramento dessas populações em relação ao temephos deve ser contínuo, visto que futuramente este larvicida pode ser utilizado novamente. Lembrando sempre que o controle do *Aedes aegypti* depende em grande medida de mudanças culturais da sociedade em evitar a geração de criadouros em potencial (GUIRADO *et al.*, 2009), do que dos inseticidas químicos.

Com relação à suscetibilidade dos adultos aos piretróides observamos resistência de *Aedes aegypti* a este inseticida no município de Foz do Iguaçu através de ensaios biológicos. Fato que foi corroborado quando analisamos a mutação no

fragmento do gene do canal de sódio voltagem-dependente e observamos que em todos os estratos ocorre o alelo da mutação 1016Ile, que quando em homozigose recessiva esta relacionado com a resistência a piretróides.

Observamos o predomínio de heterozigotos em quase todos os estratos que representam toda a área urbana, com exceção do estrato três. Apesar da superioridade heterozigótica em relação aos dois genótipos, o acasalamento entre indivíduos heterozigotos resulta em 25% da progênie com o genótipo homozigoto recessivo para a mutação 1016Ile (SALMAN, 2007).

Em análise anterior da população de *Aedes aegypti* em Foz do Iguaçu Martins *et al.* (2009) utilizaram áreas *hot spots* com intensa aplicação de inseticidas, detectando o alelo 1016Ile na frequência de 0,74, superior à frequência para o mesmo alelo encontrado no presente trabalho (0,54). A presente pesquisa inclui uma cobertura espacial mais ampla. No entanto observamos elevada frequência do alelo 1016Ile nos dois trabalhos, o que retrata a elevada pressão de seleção causada por piretróides no município.

A associação entre o elevado número de indivíduos utilizados para análise e ampla distribuição geográfica das coletas no presente trabalho, permitiu mostrar que a distribuição espacial do genótipo que apresenta o alelo recessivo não é aleatória nos fragmentos da área urbana. Nas análises da frequência da mutação 1016 é estratégica a utilização de elevado número de indivíduos com ampla cobertura espacial. Localidades mesmo próximas podem apresentar frequências alélicas bem distintas, fato que corrobora Garcia *et al.* (2009). Estes autores detectaram aumentos dramáticos nas frequências de 1016Ile desde o final de 1990 para 2006 - 2009 em vários estados do México. Em Nuevo Leon, os primeiros relatos de detecção de 1016Ile foram em 1997. Em 2003 e 2004 a frequência desta mutação tinha aumentado aproximadamente 100%. Foi encontrada heterogeneidade espacial entre dois Estados e também em menores escalas geográficas. Por exemplo, dentro da cidade de Chetumal, Quintana Roo, a mutação 1016Ile teve frequências variando entre 38,3% a 88,3%.

Considerando o equilíbrio de Hardy-Weiberg (ausência de seleção, mutação, deriva genética e acasalamento preferencial), as frequências genóticas foram alteradas, mas as frequências alélicas não são alteradas, a herança mendeliana as mantém constantes (HARTL, 2008). O aumento da frequência do genótipo Ile/Ile nos

próximos anos depende da intensidade e persistência das ações de controle com inseticidas de mecanismos de ação similares.

A genotipagem do *kdr* é uma ferramenta molecular para predição da eficácia dos piretróides. No presente trabalho, realizando ensaios biológicos e moleculares encontramos associação entre a resistência a piretróides e a mutação Val1016Ile. A detecção das mutações no canal de sódio voltagem-dependente em populações de campo tem consequências graves para a sustentação do uso de piretróides no controle de mosquitos (SODERLUND & KNIPPLE, 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; DONNELLY *et al.*, 2009). Certamente as populações de *Aedes aegypti* de campo devem ser continuamente monitoradas para manter ou restaurar a suscetibilidade aos piretróides, tendo em vista que poucas são as opções de controle químico com diferentes mecanismos de resistência.

Em relação à variabilidade genética, o haplótipo H1 foi encontrado em elevada frequência sendo 100% semelhante ao haplótipo H6 (GenBank: EU650410.1) encontrado por Lima-Júnior e Scarpassa (2009), nos Estados do Pará, Acre e na Amazônia brasileira e ao haplótipo H19 (GenBank: AY906853) encontrado por Paduan e Ribolla (2008) na cidade de Barretos (São Paulo). O haplótipo H2 foi encontrado em menor frequência, sendo 100 % semelhante ao haplótipo H10 (GenBank: EU650414.1) de Lima-Júnior e Scarpassa (2009) na cidade de Belém (Pará) e H23 (GenBank: AF334863) de Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2002) no México. A distribuição das variantes genéticas em populações naturais é consequência de várias forças evolutivas e fatores demográficos, incluindo a deriva genética, seleção, recombinação, mutação, fluxo gênico, acasalamento e colonização (SLATKIN, 1985).

Os valores de diversidade genética ($Hd= 0.1310$ e $\pi= 0.0047$) foram considerados baixos em relação a outros estudos utilizando ND4 em *Aedes aegypti*, como por exemplo, Bracco *et al.* (2007) analisando 36 localidades das Américas, Ásia e África encontraram $Hd= 0.8200$ e $\pi= 0.0199$; Paduan e Ribolla (2008) analisando cinco Estados brasileiros ($Hd= 0.8000$ e $\pi= 0.0107$), visto que na presente pesquisa foi analisado diferentes regiões de apenas um município com distâncias geográficas menores.

Os valores baixos de diversidade genética sugerem uma redução no tamanho da população que pode ter sofrido um “efeito gargalo de garrafa” recente. Esse efeito na população traduz-se na redução da diversidade genética no nível do *pool*

genético original. Isso pode ter sido provocado pelas campanhas de controle químico de inseticidas que tem como objetivo reduzir o tamanho efetivo da população. Polimorfismos genéticos são esperados a declinar rapidamente durante a utilização de inseticidas em qualquer lugar no genoma do mosquito (YAN *et al.*, 1998).

Os testes de neutralidade aplicados não foram significativos, sugerindo que as populações estão de acordo com as premissas do modelo neutro. De acordo com Kimura (1968) as alterações ao longo das gerações são rápidas para serem explicadas pela seleção natural, portanto a maioria delas são seletivamente neutras, não representando nenhum efeito no valor adaptativo da espécie.

Foi observada a existência de quatro indivíduos com mais de um genótipo de DNA mitocondrial, fenômeno chamado de heteroplasma (BUTLER & LEVIN, 1998). Em um mesmo indivíduo foi observado até cinco sítios com dois nucleotídeos diferentes. Isso já tinha sido observado em *Aedes aegypti* por Paduan e Ribolla (2008). Uma célula pode se tornar heteroplasmica através de uma linhagem germinativa ou uma mutação somática, assim, heteroplasma pode ser herdada ou somática (CALLOWAY *et al.*, 2000). Um mecanismo que explica a heteroplasma herdada e já foi observado em *Drosophila* seria a herança mitocondrial biparental, onde o pai contribui com um pequeno número de moléculas de DNA mitocondrial para a progênie (KONDO *et al.*, 1990). Outra explicação para o aparecimento de mais de um genótipo no mesmo indivíduo seria o sequenciamento de um pseudogene nuclear no DNA mitocondrial dentro das células, fato já relatado em *A. aegypti* por Hlaing *et al.* (2009). Todos os casos de heteroplasma ocorreram nos sítios polimórficos descritos neste estudo, por isso um das explicações possíveis seria a herança mitocondrial biparental.

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que quase a totalidade da variação encontrada ocorreu dentro das populações (99,78%), enquanto a variação entre as populações foi extremamente baixa (0,22%). O valor do índice de fixação $F_{st} = 0,00217$ foi extremamente baixo e o fluxo gênico (Nm) de 230 foi elevado em relação a outros estudos com *Aedes aegypti*. Ayres *et al.* (2003) com a técnica de RAPD, encontraram para as populações brasileiras valores de $F_{st} = 0,317$ e $Nm = 0,54$. Os valores da variância molecular encontrados no presente estudo sugerem que as populações de *A. aegypti* da cidade de Foz do Iguaçu não encontram-se geneticamente estruturadas. Segundo Yan *et al.* (1998) assumir que populações de

vetores apresentam equilíbrio genético pode ser tendencioso. Pois o intervalo entre a aplicação do inseticida é normalmente entre três a quatro meses, muito menor do que o tempo necessário para esta população alcançar equilíbrio genético.

Apesar da divisão do município de Foz do Iguaçu ter sido realizada em estratos, foi observado que existe uma semelhança genética no município como um todo, devido à pequena distância geográfica das sub-regiões analisadas e ao extenso fluxo gênico atual entre elas, refletindo a homogeneidade genética. O fluxo gênico elevado pode explicar a rápida disseminação do gene envolvido com a resistência a insecticidas.

As duas linhagem mitocondriais encontradas apresentam o alelo da mutação 10161le, que em homozigose recessiva está correlacionado com a resistência. No entanto, a variabilidade genética difere substancialmente de genes em diferentes regiões genoma (AQUADRO, 1992), por isso seria necessária a utilização de diferentes marcadores moleculares para compreender os processos que a pressão de seleção ocasiona na variabilidade genética dos indivíduos.

Muitos parâmetros aqui apresentados podem mudar aspectos importantes relacionados à competência e capacidade vetora de *Aedes aegypti*. O efeito gargalo de garrafa e/ou deriva genética pode mudar radicalmente o fenótipo da população com relação a competência vetorial (BOSIO *et al.*, 2005). A variação individual de *A. aegypti* em relação à sua susceptibilidade ao vírus dengue deriva em parte das interações entre os genomas do mosquito e do vírus, com o potencial de infecção dependendo da combinação específica do genótipo do vetor e vírus (LAMBRECHTS *et al.*, 2009; LAMBRECHTS, 2011). A resistência a piretróides também pode afetar aspectos relacionados com a capacidade vetora como, por exemplo, a longevidade (duração do período de incubação extrínseco), quantidade de sangue ingerido (número de ovos e partículas virais ingeridas), redução do número e viabilidade dos ovos (MARTINS *et al.*, 2012).

Por isso conhecimento da dinâmica local e informações sobre a genética de populações de *Aedes aegypti* ao longo do tempo e do espaço devem ser considerados durante vigilância entomológica, e utilizada na formulação de planos para controlar a população do vetor.

6 CONCLUSÕES

1. A população de *Aedes aegypti* da região Norte de Foz do Iguaçu apresenta alteração no *status* de suscetibilidade e as populações da região Central e Sul apresentam resistência ao larvicida temephos.
2. A população de *Aedes aegypti* de Foz do Iguaçu apresenta resistência a piretróides. O alelo mutante 1016Ile está distribuído em todas as regiões do município.
3. Na população de *Aedes aegypti* de Foz do Iguaçu foram detectadas duas linhagens mitocondriais, com reduzida diversidade genética, e elevado fluxo gênico.
4. As duas linhagens mitocondriais encontradas apresentam o alelo mutante (1016Ile).

7 REFERÊNCIAS

AQUADRO C. F. Why is the genome variable? Insights from *Drosophila*. **Trends in Genetics**, v. 8, p.355-362, 1992.

AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS, M. A. V.; SOLE-CAVA, A. M.; FURTADO, A. F. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 430-435, 2003.

AYRES M.; AYRES-JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Sociedade Civil de Mamirauá. Belém, Pará, Brasil, 364p., 2007.

BALLARD, J.W.O.; WHITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO JR, F. P. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 303-307, 2007.

BIRUNGI, J.; MUNSTERMANN, L. E. Genetic Structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brazil and United States. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, p.125-132, 2002.

BOSIO, C. F.; HARRINGTON, L. C.; JONES, J. W.; SITHIPRASASNA, R.; NORRIS, D. E.; SCOTT, T. W. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p. 434– 442, 2005.

BRACCO, J. E.; CAPURRO, M. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. R; SALLUM, M. A. M. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 573-580, 2007.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. a. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia Serviço e Saúde**, v. 16, p. 279-293, 2007.

_____.b. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia Serviço e Saúde** , v.16, p. 113-118, 2007.

BRENGUES, C.; HAWKES, N. J.; CHANDRE, F.; MCCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.; MANGUIN, S.; MORGAN, J. C.; HEMINGWAY, J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 87-94, 2003.

BUTLER, J. M.; LEVIN, B. C. Forensic applications of mitochondrial DNA. **Tibtech**, v. 16, p. 158-162, 1998.

CALLOWAY, C. D.; REYNOLDS, R. L.; HERRIN JR., G.L.; WYATT, W. A. The Frequency of Heteroplasmy in the HVII Region of mtDNA Differs across Tissue Types and Increases with Age. **American Journal of Human Genetics**, v. 66, p.1384–1397, 2000.

CARVALHO, M. S. L. de; CALDAS, E. D.; YOSHIZAWA, M. A.C.; DEGALLIER, N.; OLIVEIRA, C; KNOX, M. B. Susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal, em 2000. **Informe Epidemiológico do SUS**; v.10, p. 41-43, 2001.

CHANG, C.; SHEN, W.-K.; WANG, T. T.; LIN, Y. H.; HSU, E. L.; DAI, S. M. A novel ami-no acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 272–278, 2009.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LAUNDRY, B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications**, v. 3, p. 69-70, 1993.

DUQUE, L. J. E. **Descrição e análise de fatores epidemiológicos, vetoriais e do controle da dengue no estado do Paraná, Brasil**. Tese apresentada a Universidade Federal do Paraná, 150p., 2008.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L.; BRACCO, J. E. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 639-644, 2005.

DAVIES, T. G. M.; O'REILLY, A. O.; FIELD, L. M.; WALLACE, B. A.; WILLIAMSON, M. S. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modeling. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1126-1130, 2008.

DONNELLY, M. J.; CORBEL, V.; WEETMAN, D.; WILDING, C. S.; WILLIAMSON, M. S.; BLACK, W. C. Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 213-219, 2009.

DUQUE, J.E.L; MARTINS, M. F.; ANJOS, A.F. dos; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 842-843, 2004.

DUQUE, L. J. E.; DA SILVA, R. V.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO- SILVA, M. A. Dengue no Estado do Paraná, Brasil: distribuição temporal e espacial no período 1995-2007. **Salud UIS**, v. 42, p. 113-122, 2010.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition sites as surveillance methods for *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 26, p.531-535, 1966.

FERREIRA, M.; AGUIAR, T.; VILARINHO, L. Cadeia respiratória mitocondrial. Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. **Arquivos de Medicina**, v. 22, p. 49-56, 2008.

FINNEY, D. J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition.

GARCÍA, G. P.; FLORES, A. E.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, K.; REYES-SOLIS, G.; LOZANO-FUENTES, S.; BOND, J. G.; CASAS-MARTÍNEZ, M.; RAMSEY, J. M.; GARCÍA-REJÓN, J.; DOMÍNGUEZ-GALERA, M.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; EISEN, L.; BLACK, W.C. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p.531-541, 2009.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N.; GÓMEZ-MACHORRO, C.; LOZANO-FUENTES, S.; FERNANDEZ-SALAS, I.; MUNOZ, M.L.; FARFAN-ALE, J.A.; GARCIA-REJON, J.; BEATY, B.J.; BLACK IV, W.C. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in México varies by region. **American Journal of Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 213-222, 2002.

GUIRADO, M. M.; BICUSO, H. E. M. C. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, p.5-14, 2009.

HALL, T. **Bioedit version 7.0.0**. Ibis Therapeutics Carlsbad, CA, 2004.

HARTHL D. L. **Princípios de genética de populações**. 3ª edição. Ribeirão Preto: FUNPEC, 217 pp., 2008.

HEMME, R. R.; THOMAS, C. L.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short- distance migrant mosquito: Evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 634-643, 2010.

HERRERA, F.; URDANETA, L.; RIVERO, J.; ZOGHBI, N.; RUIZ, J.; CARRASQUEL, G.; MARTÍNEZ, J. A.; PENALETE, M.; VILLEGAS, P.; MONTOYA, A.; RUBIO-PALIS, Y.; ROJAS, E. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 625-633, 2006.

HIRAGI, C.; SIMÕES, K.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; LIMA, L.; MONNERAT, R. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 542-547, 2009.

HLAING, T.; TUN-LIN, W.; SOMBOON, P.; SOCHEAT, D.; SETHA, T.; MIN SEIN, C.; SENG, M. ; CATHERINE, W. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. **BMC Genetics**, v. 10, p. 1-12, 2009.

IBGE, 2011. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 18/11/2011.

LIMA, E. P.; PAIVA, M. H. S.; ARAÚJO, A. P.; SILVA, E. V. G.; SILVA, U. M.; OLIVEIRA, L. N.; SANTANA, A. E. G.; BARBOSA, C. N.; PAIVA-NETO, C. C.de; GOULART, M.O. F.; WILDING, C. S.; AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS, M. A. V. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1-12, 2011.

JULIO, N. B.; CHIAPPERO, M. B.; ROSSI, H. J.; DUEÑAS, J. C. R.; GARDENAL, C. N. (). Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested área. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 626-631, 2009.

KAWADA, H.; HIGA, Y.; KOMA GATA, O.; KASAI, S.; TOMITA, T.; THI YEN, N.; LOAN, L. L.; SÁNCHEZ, R. A. P.; TAKAGI, M. Widespread Distribution of a newly found point mutati on in voltage-gate d sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populat ions in Vietnam. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 3, e527, 2009.

KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v. 217, p. 624-626, 1968.

KONDO, R.; SATTA, Y.; MATSUURA E. T.; ISHIWA, H.; TAKAHATAT, N.; CHIGUSA, S. I. Incomplete Maternal Transmission of Mitochondrial DNA in *Drosophila*. **Genetics**, v. 126, p. 657-663, 1990.

LAMBRECHTS, L.; CHEVILLON, C.; ALBRIGHT, R. G.; THAISOMBOONSUK, B.; RICHARDSON, J. H.; JARMAN, R. G.; SCOTT, T. W. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 160-171, 2009.

LAMBRECHTS, L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm ? **Trends in Parasitology**, v. 1007, p.1-4, 2011.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIMA, J. B. P.; PEREIRA DA CUNHA, M.; SILVA-JR, R. C. S.; GALARDO, A. K. R.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A.; RAMOS, R. P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 329-333, 2003.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA-FILHO, A. M.; LIMA, J. W. O.; RAMOS-JÚNIOR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 259-263, 2006.

LIMA-JÚNIOR, R. S.; SCARPASSA, V. M. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 414-422, 2009.

LOPES, J.; SILVA, M. A. N.; BORSATO, A. M.; OLIVEIRA, V. D. R. B.; OLIVEIRA, F. J. A. *Aedes (Stegomyia) aegypti* e a culicedeofauna associada a área urbana da região sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 326-33, 1993.

MACORIS, M. L. G.; CAMARGO, M. F.; SILVA, I. G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M. T. Modificação da susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temefos. **Revista de Patologia Tropical**, v.24, p. 31-40, 1995.

MACORIS, M. L. D.; ANDRIGHETTI, M. T.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; CARBELOTO, V. C.; BRACCO, J. E. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 703-708, 2003.

MARTINS, A. J.; LIMA, J. B. P.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Frequency of Val1016Ile mutations in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. **Tropical Medicine & International Health**, v.14, p. 1351-1355, 2009.

MARTINS, F. M. de; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. In: CARVALHO, C. J. B. de; ALMEIDA, E. A. B. **Biogeografia da América do Sul: padrões & processos**. São Paulo, Editora Roca, v. 1, p. 137-150, 2011.

MARTINS, A. J.; RIBEIRO, C. D. M. ; BELLINATO, D. F.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D.; LIMA, J. B. P. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. **Plos One**, v. 7, p. e31889, 2012.

MAZZARI, M. B; GEORGHIO, G.P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11,p. 315 -322, 1995.

MELO, M. E. B.; MERLO, K. C.; FERNANDES, R. R. C., LUNA, C. F.; DINIZ, G. T. N.; CATANHO, M. T. J. A; REGIS, L. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temephos em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, p. 196-201, 2008.

MELO-SANTOS, M. A. V.; VARJAL-MELO, J. J.; ARAÚJO, A. P.; GOMES, T. C. S.; PAIVA, M. H.; REGIS, L. N.; FURTADO, A. F.; MAGALHÃES, T.; MACORIS, M. L.; ANDRIGHETTI, M. T.; AYRES, C. F. J. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, p. 180-189, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil - LIRAA. Metodologia para avaliação dos índices do Breteau e Predial**. Brasília DF, 59 p., 2005.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. **Reunião técnica para discutir status de resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas**, 2006.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUILL, P. L. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 59-66, 1994.

PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 45, p. 59-67, 2008.

PAUPY, C.; BRENGUES, C; NDIATHC, O.; TOTYB, C.; HERVÉB, J.P.; SIMARD, F. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 473-480, 2010.

PEREIRA-DA-CUNHA, M.; LIMA, J. B.P.; BROGDON, W. G.; MOYA, G. E.; VALLE, D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 441-444, 2005.

PROPHIRO, J. S.; SILVA, O. S.; LUNA, J. E. D.; PICCOLI, C. F.; KANIS, L. A.; NAVARRO-SILVA, M. A. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 300-305, 2011.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; URDANETA-MARQUEZ, L.; RAJATILEKA, S.; MOULTON, M.; FLORES, A.E.; FERNANDEZ-SALAS, I.; BISSET, J.; RODRIGUEZ, M.; MCCALL, P. J.; DONNELLY, M.J.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W.C. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 16, p. 785-798, 2007.

SALMAN, A. K. D. **Conceitos básicos de genética de populações**. Documentos 118/ Embrapa, Rondônia. Porto Velho – RO, 27, p. 2007.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 339-349, 2007.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 16, p. 393-430, 1985.

SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid Insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 563–577, 2003.

SRISAWAT, R.; KOMALAMISRA, N.; ESHITA, Y.; ZHENG, M.; ONO, K.; ITOH, T.Q.; MATSUMOTO, A.; PETMITR, S.; RONGSRIYAM, Y. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene indeltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 45, p. 275–282, 2010.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 4673-4680, 1994.

URDANETA-MARQUEZ, L.; BOSIO, C.; HERRERA, F.; RUBIO-PALIS, Y.; SALASEK, M.; BLACK, W. C. Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 479–491, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO a. **Instructions for determining the susceptibility resistance of mosquito larvae to insecticides**. WHO/VBC/81.807, Geneva, 6 pp, 1981.

_____ b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the susceptibility or Resistance of Insects to insecticides**, WHO/VBC/81.806, Geneva: 4 pp, 1981.

_____ c. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides**. Establishment of the baseline, WHO/VBC/81.805. Geneva: 4 pp, 1981.

_____. **Vector resistance to pesticides**, Technical Report Series No. 818, Geneva: 62 pp, 1992.

_____. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces**. WHO/CDS/CPC/ MAL/98.12, Geneva: 43 pp., 1998.

YAN, G.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D.W. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 148, p. 793-800, 1998.

YANOLA, J.; SOMBOON, P.; WALTON, C.; NACHAIWIENG, W.; PRAPANTHADARA, L. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 127–131, 2010.

YU, F.H.; CATTERALL, W.A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biology**, v. 4, p. 207, 2003.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. Upper Saddle River, N.J.: Prentice-Hall. 944 p., 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ciclo da dengue três componentes principais devem ser avaliados o vírus, o homem e o vetor. O vírus é um elemento de fundamental importância visto que pode sofrer mutações que podem alterar sua virulência, e se dispersa facilmente num hospedeiro infectado podendo atingir áreas com milhões de suscetíveis, provocando epidemias. O Estado do Paraná neste contexto faz fronteira com outros países da América do Sul, bem como com outros Estados brasileiros que apresentam elevada incidência da doença. Além de apresentar pólos turísticos que atraem milhões de pessoas anualmente. Na região Sul o Paraná é o Estado com maior número de casos de dengue, por isso a necessidade de investigar os sorotipos circulantes e os genótipos que acarretam grandes epidemias como a ocorrida em 2010. Esta pesquisa foi a primeira que relata casos de co-infecção por DENV-1 e DENV-2 em pacientes no Estado. Fato comum em região hiperendêmicas. Além disso, mostra a diversidade de cepas circulantes no Estado. A partir deste trabalho muitos outros poderão ser realizados para que seja construída uma base histórica de dados que pode facilitar o entendimento de como o vírus dengue afeta o Estado e quais as medidas que deverão ser adotadas para minimizar os riscos do agravo à saúde.

Com intuito de fornecer conhecimentos para evitar que a problemática da doença se estenda até o homem, nós avaliamos o vetor em alguns parâmetros: resistência a inseticidas, diversidade genética e como elemento da vigilância virológica. Para isso foi escolhida uma área de extrema importância para o Estado do Paraná o município de Foz do Iguaçu.

Observamos que as ações de controle do *A. aegypti* em Foz do Iguaçu utilizando temephos e piretróides podem ser comprometidas devido à perda de suscetibilidade do vetor a estes inseticidas. Apesar do município ser uma área propícia a entrada de novas linhagens do vetor *A. aegypti*, encontramos uma baixa diversidade genética e apenas duas linhagens mitocondriais. Outros estudos poderiam ser realizados com outros marcadores moleculares a fim de comparar com os dados encontrados, visto que a diversidade genética difere substancialmente de genes em diferentes regiões genoma.

Em relação a vigilância virológica, nós pretendíamos inseri-la nos procedimentos de vigilância entomológica já adotados na rotina de trabalho do município. Verificando a possibilidade de uma vigilância virológica em larga escala utilizando RT-PCR e a armadilha Adultrap®. Essa armadilha demonstrou ser um método eficiente principalmente quando o objetivo é monitorar as fêmeas de *Aedes aegypti*, para estudos de vigilância virológica. Já o RT-PCR, apresenta custo elevado, e facilmente pode dar resultados negativos devido a degradação do RNA, fato que em larga escala pode ser um problema. Uma alternativa seria a detecção do antígeno NS1, que apresenta um custo menor que o RT-PCR e é capaz de detectar o vírus dengue em mosquitos não necessariamente congelados à temperatura -70°C. No entanto esta técnica não detecta os sorotipos, ela poderia fornecer uma pré-triagem dos mosquitos infectados para assim estes serem avaliados pelo RT-PCR. Ainda são necessários no processo de estruturação da vigilância entomológica, com ênfase na detecção viral precoce ainda no vetor, mais estudos que viabilizem a utilização de técnicas de reduzido custo aliado a elevada eficiência e confiabilidade.

ANEXO

Reagentes específicos, concentrações e custo por *pool* de mosquitos analisados pela técnica RT-PCR.

Etapas	Reagentes	Fabricante	Embalagem	Preço	Concentração utilizada	Temperatura de estoque	Quantidade por teste	Número de testes/frasco	Valor unitário aproximado de cada reação
Extração de RNA	QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen	x	R\$ 3.724.00	x	15 a 20	x	250	14.896
	Subtotal								14.896
Transcrição reversa	Primer D2	IDT	413 pmoles/μl	R\$ 60.90	50 pmol	-20	1 μl	800	0.076
	dNTP	Amresco	25mM (400 μl)	R\$ 477.05	200uM	-20	0,5 μl	20000	0.002
	AMV Transcripase Reversa com tampão 10X e MgCl ₂	Promega	10 unidades/μl (20 μl)	R\$ 620.00	20U	-20	2 μl	50	12.240
	Subtotal								12.318
PCR	Primer D1	IDT	244 pmoles/μl	R\$ 60.90	20 pmol	-20	1 μl	1200	0.051
	Primer D2	IDT	413 pmoles/μl	R\$ 60.90	20 pmol	-20	1 μl	2000	0.030
	dNTP	Amresco	25mM (400 μl)	R\$ 477.05	200uM	-20	0,5 μl	20000	0.002
	Taq DNA Polimerase com tampão 10x contendo MgCl ₂	Applied Biosystems	5 unidades/μl (50 μl)	R\$ 610.30	3U	-20	0,6 μl	83	7.350
	Subtotal								7.433
nested PCR	Primer D1	IDT	244 pmoles/μl	R\$ 60.90	20 pmol	-20	1 μl	1200	0.051
	Primer TS1	IDT	207 pmoles/μl	R\$ 39.90	20 pmol	-20	1 μl	1000	0.040
	Primer TS2	IDT	334 pmoles/μl	R\$ 46.20	20 pmol	-20	1 μl	1600	0.029
	Primer TS3	IDT	303 pmoles/μl	R\$ 46.20	20 pmol	-20	1 μl	1500	0.031
	Primer TS4	IDT	327 pmoles/μl	R\$ 44.10	20 pmol	-20	1 μl	1600	0.028
	dNTP	Amresco	25mM (400 μl)	R\$ 477.05	200uM	-20	0,5 μl	20000	0.002
	Taq DNA Polimerase com tampão 10x contendo MgCl ₂	Applied Biosystems	5 unidades/μl (50 μl)	R\$ 610.30	3U	-20	0,6 μl	83	7.350
	Subtotal								7.531