**ESTUDO DA COMPETÊNCIA VETORA DE POPULAÇÕES DE
Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) (DIPTERA:
CULICIDAE) DO ESTADO DE SÃO PAULO PARA OS VÍRUS
DENGUE E ENCEFALOMIELE ENCEFALOMIELITE EQUINA VENEZUELANA E
DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO À INFECÇÃO NA
LONGEVIDADE.**

ZORAIDA DEL C. FERNÁNDEZ GRILLO

Tese apresentada na área de concentração
de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Grau de Doutor.

Área de concentração: Epidemiologia.

**ORIENTADOR: PROF. CATEDRÁTICO
OSWALDO PAULO FORATTINI**

São Paulo
2003

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data: 12 de junho de 2003

43840/2003 doc

"A persistência é a capacidade para se enfrentar com a derrota uma e outra vez sem renunciar nunca à vitória final"

(Anônimo)

À minha mãe
com especial amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Oswaldo Paulo Forattini, pela orientação do trabalho de dissertação, pela confiança na minha pessoa e pela sua inestimável e sincera amizade durante a realização do Doutorado.

Ao Dr. Scott Weaver, pela cooperação e orientação na realização dos experimentos de competência vetora, e aos pesquisadores e técnicos do laboratório de Patologia da “University of Texas Medical Branch” de Galveston, Texas, U.S.A., pela colaboração prestada durante minha passagem nessa instituição.

À Profa. Dra. Maria Anice Sallum, pelo apoio e amizade incondicionais, e pelas sugestões feitas ao manuscrito.

À Profa. Dra. Iná Kakitani e aos funcionários do laboratório de Culicidologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela ajuda oferecida nas atividades de laboratório.

Aos funcionários do posto de pesquisa da Faculdade de Saúde Pública, de Pariquera-açú, e da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Taubaté, Estado de São Paulo, pela colaboração na coleta dos mosquitos.

Ao laboratório de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, pelo fornecimento das cepas do vírus dengue.

A todos os amigos e colegas que me acompanharam durante esses anos de estudo, deixando-os muito mais agradáveis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(Fapesp), pela bolsa de estudo concedida (protocolo 99/07578-9).

Ao Núcleo de Pesquisa Taxonômica e Sistemática em Entomologia Médica (NUPTM), e ao Projeto Temático, protocolo 99/10517-1, pelo apoio na realização do trabalho de dissertação.

LISTA DE ABREVIATURAS

BEM: Barreira de escape do mesentério

BIM: Barreira à infecção no mesentério

C:E: Fotoperíodo claro:escuro.

DENV: Vírus dengue (ICTV 2000).

DENV-1: Sorotipo 1 do vírus dengue (ICTV 2000)

DENV-2: Sorotipo 2 do vírus dengue (ICTV 2000)

DF: "Dengue fever" ou febre da dengue.

DHF: "Dengue hemorrhagic fever" ou febre hemorrágica da dengue.

DSAS: "Dengue with signs associated with shock" ou sintomas da dengue associados com choque.

DSS: "Dengue shock syndrome" ou dengue com síndrome de choque.

EEEV: Vírus da encefalomielite eqüina do Leste (ICTV 2000).

EGS: Escape das glândulas salivares

F1: Primeira geração

F2: Segunda geração.

IC: Subtipo epizoótico I, variedade C, do vírus da encefalomielite eqüina venezuelana.

ID: Subtipo enzoótico I, variedade D, do vírus da encefalomielite eqüina venezuelana.

IF: Subtipo enzoótico I, complexo F, do vírus da encefalomielite eqüina venezuelana.

IFA: Técnica de imunofluorescência.

IGS: Infecção das glândulas salivares

MEM: meio “minimum essencial Eagles”

P.E.G.: “Polyethylene glycol”

RVFV: Vírus da febre de “Rift Valley” (ICTV 2000)

SFB: Soro fetal bovino

TCID₅₀: “Tissue culture infectious dose₅₀”

UR: Umidade relativa

UTMB: “University of Texas Medical Branch”

VEEV: Vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (ICTV 2000).

RESUMO

Fernández, Z. **Estudo da competência vetora de populações de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) do Estado de São Paulo para os vírus dengue e encefalomielite eqüina venezuelana e do efeito da exposição à infecção na longevidade.** São Paulo; 2003. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objetivos. Avaliar a competência vetora de populações de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba (localidade urbana) e do Vale do Ribeira (localidade rural) (Estado de São Paulo) para os vírus DENV-1 e DENV-2 e os subtipos IC, ID e IF do VEEV, e a influência da infecção na sobrevivência dos mosquitos.

Métodos. Fêmeas com 4-6 dias de idade foram infectadas por via oral com DENV-1 e DENV-2 e com os subtipos IC, ID e IF do VEEV. Foram determinadas as porcentagens de infecção, disseminação e transmissão dos vírus. Foram construídas tabelas de sobrevivência em mosquitos não expostos e expostos aos vírus.

Resultados. As taxas de infecção para DENV-1 e DENV-2 foram baixas nas duas populações de *Ae. albopictus*. Não foi detectada transmissão desses vírus, mas sim a disseminação deles. A longevidade dos mosquitos não foi afetada pela exposição à infecção ao DENV. As taxas de infecção foram elevadas para os subtipos IC e ID do VEEV, mas baixas para o subtipo IF. Porém os títulos de infecção nos três casos foram elevados. Foi detectada a transmissão dos subtipos IC e ID. A longevidade dos mosquitos diminuiu em decorrência da exposição à infecção com o subtipo IC. **Conclusões.** As populações de *Ae. albopictus* avaliadas são susceptíveis à infecção pelo DENV e competentes para transmitir os subtipos enzoóticos e epizoóticos do VEEV. Outros estudos com o subtipo IF devem ser realizados. A longevidade foi afetada pela infecção com o subtipo IC do VEEV.

Descritores: *Ae. albopictus*, dengue, encefalomielite eqüina venezuelana, competência vetora, longevidade

SUMMARY

Fernández, Z. **Estudo da competência vetora de populações de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) do Estado de São Paulo para os vírus dengue e encefalomielite eqüina venezuelana e do efeito da exposição à infecção na longevidade.** [Study of the vector competence of populations of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) from São Paulo State (Brazil) for dengue and Venezuelan equine encephalitis viruses and the effect of the exposition to infection on the longevity]. São Paulo (BR); 2003. [PhD -Thesis, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brazil].

Objectives. To evaluate the vector competence of *Ae. albopictus* populations from Vale do Paraíba (urban locality) and Vale do Ribeira (rural locality) for DENV-1 and DENV-2 and IC, ID and IF subtypes of VEEV and the effect of infection on mosquito longevity. **Methods.** Four to 6 days old females were orally infected with DENV-1 and DENV-2 and, IC, ID and IF subtypes of VEEV. Infection, dissemination and transmission rates of viruses were determined. Life tables were constructed for mosquitoes that were not exposed and exposed to virus infection. **Results.** The populations of *Ae. albopictus* shown low rates of infection for DENV-1 and DENV-2. Spite of the dissemination of those viruses, the transmission was not detected. The longevity of mosquito populations was not affected by the exposition to DENV infection. The infection rates for IC and ID of VEEV were high but lower for IF subtype. However, the titers of infection for the three subtypes were higher. The transmission for IC and ID subtypes was detected. The longevity of mosquitoes was reduced after the exposition to IC infection. **Conclusions.** The *Ae. albopictus* populations evaluated are susceptible for DENV infection and competent to transmit enzootic and epizootic subtypes of VEEV. Another studies must be done with IF subtype. The longevity could be affected by the infection with IC subtype of VEEV.

Descriptors: *Ae. albopictus*, dengue, venezuelan equine encephalitis, vector competence, longevity.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.

Tabela 1. Porcentagens de infecção e disseminação em exemplares de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira expostos ao DENV-1 e DENV-2	39
Tabela 2. Média dos títulos (Log_{10} TCID ₅₀ ml. ⁻¹) de infecção e disseminação do DENV-1 e DENV-2 em exemplares de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira	40
Tabela 3. Esperança média de vida (êo) das fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira não expostas e expostas ao DENV-1 e DENV-2	40
Tabela 4. Fonte, história de passagens e título dos subtipos IC, ID e IF do VEEV	54
Tabela 5. Porcentagens de infecção, disseminação e transmissão em exemplares de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira expostos aos subtipos IC, ID e IF do VEEV	55
Tabela 6. Média dos títulos (Log_{10} PFU/ml) de infecção e transmissão dos subtipos de VEEV em exemplares de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira	56
Tabela 7. Esperança média de vida (êo) das fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira não infectadas e infectadas com VEEV IC 243937	56

Figura 1. Localização do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira nos Estados de São Paulo e Paraná. Ampliação da área de coleta no Vale do Ribeira	41
Figura 2A. Curvas de sobrevivência (Sx) das fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba não expostas e expostas ao DENV-1 e DENV-2	42
Figura 2B. Curvas de sobrevivência das fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Ribeira não expostas e expostas ao DENV-1 e DENV-2.	42
Figura 3. Viremia dos camundongos Swiss NIH infectados com 100 PFU dos subtipos IC, ID e IF do VEEV	57
Figura 4. Curvas de sobrevivência (Sx) das fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira não infectadas e infectadas com o subtipo IC 243937 VEEV	57

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	7
2.1 Dispersão de <i>Ae. albopictus</i> nas Américas	7
2.2 O DENV no Brasil	9
2.3 O VEEV nas Américas	12
2.4 Multiplicação e disseminação dos arbovírus nos mosquitos	14
2.5 Barreiras à infecção, disseminação e transmissão em mosquitos incompetentes	15
2.6 Efeito da infecção por arbovírus no mosquito	16
3. OBJETIVOS GERAL	18
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. JUSTIFICATIVA	19
5. CAPÍTULO I: Competência vetora de populações rural e urbana de <i>Ae. albopictus</i> do Estado de São Paulo, Brasil para DENV-1 e DENV-2	21
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1.1 Áreas de estudo	21
5.1.2 Linhagens de mosquitos	22
5.1.3 Cepas do DENV	23
5.1.4 Experimentos de infecção dos mosquitos com as cepas do DENV	25
5.1.5 Avaliação da infecção, disseminação e transmissão do DENV	26
5.1.6 Avaliação da sobrevivência em mosquitos não expostos e expostos ao DENV	27
5.1.7 Análises estatísticas	27

5.2 RESULTADOS	30
5.3 DISCUSSÃO	32
5.4 CONCLUSSÕES	37
6. CAPÍTULO II: Competência vetora de populações rural e urbana de <i>Ae. albopictus</i> do Estado de São Paulo, Brasil, para os subtipos IC, ID e complexo IF do VEEV	43
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS	43
6.1.1 Cepas do VEEV	43
6.1.2 Experimentos de infecção dos mosquitos com o VEEV	44
6.1.3 Avaliação da infecção, disseminação e transmissão do VEEV	45
6.1.4 Avaliação da sobrevivência em mosquitos infectados com o subtipo IC do VEEV	46
6.1.5 Análises estatísticas	47
6.2 RESULTADOS	48
6.3 DISCUSSÃO	50
6.4 CONCLUSSÕES	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

Aedes (Stegomyia) albopictus é espécie de origem asiática que tem se dispersado por todos os Continentes exceto o Antártico. O primeiro registro da presença da espécie no Hemisfério Ocidental ocorreu em 1985, na cidade de Houston, no Texas, E.U.A, em pneus usados (CDC 1986). No ano 2000 *Ae. albopictus* estava presente em 26 Estados dos Estados Unidos (CDC 2000).

Na América do Sul, a espécie foi identificada pela primeira vez por FORATTINI (1986) em exemplares coletados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Atualmente, está presente em 20 Estados do território brasileiro (SANTOS 2003).

Aedes albopictus tem importância epidemiológica porque é considerado vetor potencial de múltiplos agentes patogênicos. Nesse sentido, foi demonstrado que apresenta competência vetora para transmitir 22 arbovirus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae*. Entre eles vale mencionar o vírus dengue (DENV) e o da encefalomielite equina venezuelana (VEEV) (MITCHELL 1991).

A competência vetora de populações de *Ae. albopictus* da América do Norte e do Sul tem sido comparada porque essa espécie está se dispersando rapidamente no Hemisfério Ocidental (MITCHELL 1991). Acresce considerar que há hipóteses que sugerem que as populações que colonizaram a América do Norte e do Sul são de origens diferentes. Assim, as populações que se estabeleceram na América do Norte tiveram origem

de populações do Norte da Ásia, provavelmente Japão, porque ambas apresentam sensibilidade fotoperiódica (fotoperíodo crítico entre 13 e 14 horas), diapausa e resistência às baixas temperaturas. Por outro lado, as populações da América do Sul não apresentam essas mesmas características e por isso acredita-se que sejam provenientes de indivíduos oriundos de populações da Ásia tropical ou da América do Norte e, neste caso, perderam com o tempo a capacidade de diapausa (HAWLEY e col. 1987, RAI 1991).

BIRUNGI e MUNSTERMANN (2002) avaliaram o padrão de variações genéticas entre as populações de *Ae. albopictus* do Brasil e dos Estados Unidos e reexaminaram as origens geográficas das mesmas, através do seqüenciamento do gene mitocondrial ND5. As populações do Brasil foram caracterizadas por um haplótipo específico, não compartilhado com as populações dos Estados Unidos, indicando que não há intercambio genético entre as populações dos dois países. Por outro lado, a estrutura filogeográfica sugere que ambas populações tiveram diferentes origens, apoiando as colocações feitas por HAWLEY (1988). Assim mesmo, BLACK e col. (1988 a,b) e KAMBHAMPATI e col. (1990) mencionaram que, quando as populações de *Ae. albopictus* se apresentam formando pequenos grupos distantes entre si, acontecem cruzamentos dentro desses. Se os efeitos da seleção não são acentuados e não há fluxo genético entre os grupos, podem se gerar com o tempo padrões genéticos diferentes. Observações similares foram feitas por AYRES e col. (2002) em estudos de diversidade genética

com populações de *Ae. albopictus* dos Estados do Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG) e Pernambuco (PE). Os autores encontraram maior similaridade genética entre as populações de RJ e MG do que entre essas e as populações de PE. As variações observadas foram atribuídas ao efeito da deriva gênica e ao fluxo restrito dos genes entre as populações mais distantes.

O *Ae. albopictus* tem sido considerado vetor principal em epidemias de dengue nos países do leste da Ásia e do Pacífico, incluindo Havaí, Japão, Indonésia, Sul da China, Tailândia e Singapura (BOROMISA e col. 1987). MILLER e BALLINGER (1988) compararam a competência vetora de colônias de *Ae. albopictus* oriundas dos Estados Unidos (Houston, Texas) e do Brasil (Cariacica, Espírito Santo) para os quatro sorotipos do DENV. Em consequência, assinalaram que os exemplares do Brasil parecem ser menos susceptíveis à infecção e menos eficientes na transmissão destes vírus. No entanto, mencionaram que outras populações do Brasil deveriam ser avaliadas, pois a competência vetora pode ser alterada por fatores genéticos.

LOURENÇO DE OLIVEIRA e col. (2003) avaliaram a competência vetora de populações de *Ae. albopictus*, coletadas em várias localidades do Brasil, dos Estados Unidos e nas Ilhas Cayman, para o DENV-2. Os autores obtiveram maiores diferenças nas taxas de infecção entre as populações do Brasil, do que entre estas e as populações dos Estados Unidos. Assim mesmo, encontraram maiores taxas de infecção nas fêmeas da F1 (47%)

procedentes de Cariacica (Estado de Espírito Santo) do que as relatadas por MILLER E BALLINGER (1988) em fêmeas mantidas em condições de insetário por longo tempo (38%).

Embora o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) seja o principal vetor do DENV nas Américas, a recente introdução do *Ae. albopictus* e a sua competência para transmitir os quatro sorotipos do vírus suscitam a hipótese de que eventualmente poderão ocorrer alterações na ecologia do vírus, incrementando as chances de ser transmitido pelo *Ae. albopictus* nas regiões suburbanas e rurais (BOROMISA e col. 1987). Nesse sentido, vale assinalar o estudo de IBAÑEZ-BERNAL e col. (1997) que relataram evidência de infecção natural pelos sorotipos 2 e 3 do DENV em 10 machos de *Ae. albopictus*, coletados na cidade de Reynosa, México. Da mesma forma, SERUFO e col. (1993) relataram o isolamento do DENV-1 em larvas dessa espécie coletadas em pneus em região próxima à cidade de Campos Altos, Estado de Minas Gerais.

BEAMAN e TURELL (1991) demonstraram que colônias de *Ae. albopictus* procedentes dos Estados do Espírito Santo e São Paulo apresentam competência para transmitir o subtipo epizootico IAB do VEEV, sendo a taxa de transmissão (24%) similar àquela relatada para *Psorophora confinnis* (Lynch Arribáizaga) (33%) que é o vetor natural do subtipo IAB (SUDIA e col. 1971).

Subtipos epizooticos do VEEV não têm sido isolados no Brasil, porém, a possibilidade de que possa acontecer não pode ser descartada

considerando a proximidade de países onde têm ocorrido epidemias recentemente. Estudos feitos no Vale do Ribeira em 1990 (Estado de São Paulo) relataram a presença de anticorpos e casos de doença em humanos gerados pelo subtipo enzoótico IF. As aves silvestres foram assinaladas como principais reservatórios, mas não há conhecimentos sobre os possíveis vetores (ROMANO-LIEBER e IVERSSON 2000).

A variedade enzoótica ID do VEEV é transmitida entre roedores por mosquitos do subgênero *Culex* (*Melanoconion*) em ambientes silvestres. Estudos genéticos realizados por WEAVER e col. (1992) e RICO-HESSE e col. (1998) mostraram que existe estreita relação evolutiva entre a variedade ID e as variedades epizoóticas IAB e IC. Portanto, levantaram a hipótese de que essas variedades epizoóticas surgiram de um ancestral ID que circula nas regiões Leste e Central da Colômbia, Oeste da Venezuela e Norte do Peru.

Acredita-se que os arbovírus não afetam a fisiologia dos mosquitos vetores. No entanto, estudos feitos por TURELL e col. (1985), WEAVER e col. (1988) e FARAN e col. (1987) relataram mudanças patológicas nos mosquitos infectados. Por outro lado, MONCAYO e col. (2000) afirmaram que a taxa de sobrevivência de *Ae. albopictus* não foi afetada após infecção pelo vírus encefalomielite eqüina do leste (EEEV).

Estudos que avaliem a competência de populações de *Ae. albopictus* do Brasil para transmitir arbovirus, assim como o efeito da infecção na longevidade dos mosquitos devem ser realizados, considerando a ampla

dispersão dessa espécie e a probabilidade de ser vetor potencial de arbovirus de importância epidemiológica.

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

2.1 Dispersão de *Ae. albopictus* nas Américas.

Em 1985, registrou-se a presença de *Ae. albopictus* na cidade de Houston, Texas, E.U.A. Desde então, a espécie dispersou-se rapidamente para o Norte do país e para o ano 2000 estava presente em 26 Estados do território (CDC 2000).

Na América do Sul foi identificado pela primeira vez por FORATTINI (1986) ao examinar material proveniente do Estado do Rio de Janeiro. Segundo ESTRADA-FRANCO e CRAIG (1995), o *Ae. albopictus* entrou no país pelo Porto de Vitória, Estado do Espírito Santo, através do comércio de pneus com os Estados Unidos. No entanto, CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994) levantaram a hipótese de que as populações do Brasil vieram do Japão. Posteriormente, a dispersão dessa espécie para outros Estados foi rápida e, em 1996, já era registrada nos Estados de São Paulo, Paraná (SANTANA 1996), Minas Gerais, Rondônia (CHIARAVALLOTTI NETO e col. 1996; CARDOSO JUNIOR e col. 1997), Amazonas (VÉLEZ e col. 1998), Distrito Federal e Mato Grosso do Sul (SANTOS e NASCIMENTO 1998, 1999). Atualmente está presente em 20 estados brasileiros (SANTOS 2003), sendo o último registro o do Estado de Santa Catarina (LOWENBERG-NETO e NAVARRO-SILVA 2002).

O comércio contínuo de pneus usados facilitou a dispersão passiva dessa espécie para outras regiões do Continente Americano. Em 1988, foi mencionada pela primeira vez no México, na fronteira com Texas, E.U.A.

(RODRÍGUEZ-TOVAR e ORTEGA-MARTÍNEZ 1994). Na República Dominicana, foi assinalada em 1993. Acredita-se que essas populações vieram da América do Norte e que perderam a sensibilidade fotoperiódica. Outra hipótese é de que sejam oriundas da Ásia Tropical e de que vieram por via marítima (RODHAIN 1996).

Na Guatemala, em 1995, foram encontrados exemplares de *Ae. albopictus* pela primeira vez, numa localidade na fronteira com o México (OGATA e SAMAYOA 1996). Nesse mesmo ano, foram coletadas formas imaturas dessa espécie em Cuba e acredita-se que esses exemplares vieram ou da República Dominicana ou do México graças ao transporte de carga (BROCHE e BORJA 1999).

Em 1998, constatou-se pela primeira vez o *Ae. albopictus* em Letícia, Departamento de Amazônia, Colômbia. Vale assinalar que Letícia está localizada na fronteira com o Brasil (VÉLEZ e col. 1998). Mais recentemente, essa espécie foi coletada na cidade "Puerto de Buenaventura, Departamento "Valle Del Cauca", nos limites com o Oceano Pacífico ¹.

A presença de *Ae. albopictus* na Argentina foi detectada em 1998, numa localidade situada na Província de "Misiones", na fronteira com o Brasil (ROSSI e col. 1999). Foram registradas infestações por *Ae. albopictus* na Bolívia, em 1995, El Salvador, em 1996, e nas Ilhas Cayman em 1997. No entanto, não são conhecidas as origens e situação atual das mesmas (CDC 2000).

¹ Mauricio Rodríguez, com. pessoal.

2.2 O DENV no Brasil.

A dengue é arbovirose de grande importância para o homem nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É conhecida nas Américas há centenas de anos, mas foi considerada problema de saúde pública a partir do ano 1975, quando o mosquito *Ae. aegypti* reinvadiu o continente, seguido pelo *Ae. albopictus* em 1985, outro vetor potencial (WHITE e FENNER 1994).

O DENV compreende 4 sorotipos pertencentes ao grupo antigênico B da família *Flaviviridae*. Estes vírus de cadeia simples de RNA podem causar a doença dengue com gravidade clínica variada no homem. A dengue clássica (DF) caracteriza-se por manifestar febre abrupta e intermitente, cefaléia, artralgia, mialgia, dor retroorbital, vermelhidão na pele, náusea e vômitos. A doença, quando associada com sintomas de choque (DSAS), é definida por quadro hemorrágico sem manifestação de trombocitopenia nem hemoconcentração. No entanto, a febre hemorrágica de dengue (DHF) manifesta-se com hemorragias, produto da trombocitopenia, deficiência de fatores de coagulação, hemoconcentração e vasculopatia que podem evoluir para sintomatologia de síndrome de choque (DSS), podendo levar à morte (HARRIS e col. 2000).

Têm sido mencionados, na literatura, dois ciclos de transmissão do DENV, a saber: 1) os ciclos endêmico e epidêmico, sendo o *Ae. aegypti* o vetor e o homem, o hospedeiro. O *Ae. albopictus* e outros mosquitos do gênero *Aedes* podem participar desses ciclos como vetores secundários; 2)

o ciclo zoonótico ou silvestre, que ocorre nas florestas da África Ocidental, Vietnã e Malásia, envolvendo primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes* (GUBLER 1988; RICO-HESSE e col. 1997; WANG e col. 2000).

No Brasil, as primeiras referências de ocorrência de casos de dengue datam de 1917, quando ocorreram epidemias na cidade de Curitiba, Estado do Paraná, e em localidades do Estado do Rio Grande do Sul. Em 1922-1923 foram detectados casos no Estado do Rio de Janeiro, na cidade de Niterói e povoados vizinhos. Em 1904, Oswaldo Cruz iniciou uma campanha de erradicação do *Ae. aegypti*, na luta contra o vírus da febre amarela. No entanto, o intenso trabalho de erradicação dessa espécie começou em 1944, com a criação do Serviço Nacional da Febre Amarela, obtendo-se êxito em 1955. Dessa maneira, o *Ae. aegypti* esteve ausente do território nacional de 1955 a 1967 e acredita-se que entre 1923 e 1981 não houve notificação de casos de dengue (FIGUEIREDO 2000). Na década de 60, o uso indiscriminado dos inseticidas, o crescente custo desses e a resistência que os insetos expressaram, desestimularam a continuidade dos programas de erradicação em várias partes do mundo, incluindo os países próximos do Brasil. Em consequência, em 1976, o *Ae. aegypti* reentrou no território brasileiro pelo litoral paraense, dispersando-se através dos portos de Salvador e Rio de Janeiro (DONALISIO 1999).

Em 1981, houve o primeiro registro de casos clínicos de dengue em forma epidêmica, em Boa Vista, Estado de Roraima. Provavelmente, foi o reflexo da expansão da dengue que ocorreu em vários países da América

Central e Caribe. Naquela oportunidade foram isolados os sorotipos 1 e 4 (OSANAI e col. 1983 e CHIEFFI 1985).

Em 1986 foi registrada epidemia em Nova Iguaçu, no Estado do Rio de Janeiro, causada por DENV-1. Em 1987, os estados vizinhos foram atingidos detectando-se casos em Alagoas, Ceará, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Dessa maneira, entre 1986 e 1987 foram notificados 93.910 casos de dengue no Brasil (FIGUEIREDO 2000). A transmissão do vírus permaneceu discreta até o ano 1990, quando houve incremento no número de casos pela introdução do sorotipo 2 do vírus (NOGUEIRA e col. 1990, 1991). Esse sorotipo se dispersou pela costa dos Estados do nordeste brasileiro e região Amazônica, ocasionando DF e DSS.

Em 1999, foi isolado pela primeira vez no Brasil o DENV-3 de um paciente que estava retornando da Nicarágua (ROCCO e col. 2001). Porém, o primeiro caso autóctone foi registrado em 2001, no Estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA e col. 2001). A partir desse ano outros casos foram detectados nos Estados de Roraima, Pará, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002).

2.3 O VEEV nas Américas.

As primeiras epidemias e epizootias produzidas pelo VEEV foram registradas na Venezuela em 1936. No entanto, análise retrospectiva dos dados epidemiológicos sugere que ao Norte da América do Sul têm acontecido surtos desde 1920 (WEAVER 1998).

O complexo do VEEV é grupo de 13 arbovírus que estão distribuídos nas Américas. Eles estão relacionados antigenicamente e pertencem à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* (CALISHER e col. 1980). Estes vírus apresentam cadeia linear positiva de RNA. As variedades antigênicas IAB e IC foram isoladas na Colômbia e na Venezuela durante períodos epizooticos, afetando milhares de pessoas e eqüinos (KUBES e RIOS 1939; SELLERS e col. 1965 e WEAVER e col. 1996). As variedades D até o complexo F do subtipo I e os subtipos II até IV são geralmente avirulentos para os eqüinos e circulam na América do Norte, Central e do Sul em ciclos enzoóticos (WALTON e GRAYSON 1988).

As variedades IC e IAB do VEEV têm desencadeado numerosas epidemias/epizootias que na América Central e do Sul desde 1962 até os anos recentes, com exceção do período de 1973 a 1992 no qual não houve atividade epidêmica (WEAVER 1998).

Mosquitos do gênero *Culex* (*Melanoconion*) foram associados com a manutenção dos ciclos enzoóticos do vírus VEEV, exceto a variedade Bijou Bridge. Os principais hospedeiros são roedores dos gêneros *Sigmodon*, *Oryzomys*, *Zygodontomys*, *Heteromys* e *Proechimys*. As espécies *Aedes*

taeniorhynchus, *Ps. confinnis* e *Anopheles aquasalis* Curry foram consideradas vetores prováveis do vírus durante os períodos de epidemias-epizootias (WEAVER 1998).

No Brasil, não foram relatados casos de infecção ou da presença de anticorpos em humanos ou eqüinos por variedades epizoóticas do VEEV. No entanto, estudos ecológicos realizados no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil, permitiram isolar e identificar a variedade enzoótica IF ³. Esta variedade foi isolada, em 1976, de grupo de mosquitos *Culex* (*Melanoconion*) coletados no Sítio Mosso das Pedras, no município de Iguape, Estado de São Paulo. As prováveis espécies envolvidas na transmissão dos agentes virais foram provavelmente o *Cx. (Mel.) lopesi* Sirivanakarn & Jakob, *Cx. (Mel.) misionensis* Duret e uma espécie identificada como *Cx. (Mel.) aff. epanastasis* Dyar. Esta última foi identificada por SALLUM e FORATTINI (1996) como *Cx. (Mel.) ribeirensis*. A seguir obteve-se um segundo isolamento a partir do sangue de morcego da espécie *Carollia perspicillata*, capturado no mesmo município, na localidade de Ribeira (CALISHER e col. 1982). Em 1990, foi relatada a presença de anticorpos para IF em soldados que fizeram treinamento em área silvestre do Vale do Ribeira. Alguns deles tiveram doença febril e, na ocasião, detectaram-se anticorpos IgM para esse arbovírus nesses indivíduos. No mesmo ano, foi feito inquérito sorológico em moradores da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (Vale do Ribeira) e foram detectados anticorpos

³ Instituto Adolfo Lutz, com. pessoal

neutralizantes para o subtipo IF do VEEV (ROMANO-LIEBER e IVERSSON 2000).

As pesquisas entomológicas realizadas naquela região assinalaram o *Cx. (Mel.) sp.* como o possível vetor desse arbovírus. Obviamente, serão necessários estudos de campo e de laboratório que permitam elucidar o ciclo natural desse subtipo do VEEV.

2.4 Multiplicação e disseminação dos arbovirus nos mosquitos.

Considera-se importante fazer uma síntese do processo de infecção e multiplicação dos arbovírus nos órgãos do mosquito vetor, para poder entender as barreiras associadas aos mosquitos não competentes.

O sangue infectado ingerido pelo mosquito entra em contato com as células epiteliais do mesentério, as quais apresentam uma lâmina basal porosa no lado da hemocele. Essas células experimentam mudanças fisiológicas e morfológicas que permitem a digestão do sangue através dos processos de osmoregulação, síntese de produtos de secreção (membrana peritrófica e enzimas digestivas) e transporte dos nutrientes do sangue à hemocele (HARDY 1988). A infecção das células epiteliais depende da concentração de partículas virais presente no sangue, denominado “limiar de infecção” por MERRIL e TENBROECK (1935). As partículas virais se multiplicam nas células do mesentério e passam ao hemocele através da lâmina basal, infectando e multiplicando-se em outros órgãos e tecidos como são o trato digestivo, órgãos reprodutivos, gânglios, cérebro, corpos

gordurosos, pericárdio, túbulos de Malpighi, músculos e glândulas salivares. Estas últimas são infectadas ou via hemolinfa ou via sistema nervoso e geralmente, as partículas virais são detectadas nos lobos laterais desses órgãos (HARDY 1988). O período que percorre desde a infecção das células do mesentério até a infecção das glândulas salivares e transmissão ao novo hospedeiro é chamado de “período de incubação extrínseca” (BAUER e HUDSON 1928 *apud* HARDY 1988) e depende da temperatura do ambiente e da dose infectante do vírus no mesentério.

2.5 Barreiras à infecção, disseminação e transmissão em mosquitos incompetentes.

Pesquisadores mencionaram a existência de barreiras morfológicas nos mosquitos, associadas a fatores bioquímicos e biofísicos, que limitam sua competência vetora (HARDY e col. 1983). Essas barreiras já foram encontradas a nível de espécie ou entre indivíduos de uma mesma espécie (GUBLER e ROSEN 1976, GUBLER e col. 1979). MERRIL e TENBROECK (1935) demonstraram a existência de barreira à infecção no mesentério (BIM) e várias hipóteses foram levantadas para explicá-la: a diversificação do sangue ingerido para os divertículos, a presença de enzimas digestivas no lumen do mesentério, a oclusão do vírus pela membrana peritrófica, a ausência ou redução do número de receptores dos vírus nas células epiteliais e a replicação abortiva do vírus nas células do mesentério (HARDY 1988). Assim mesmo, há barreiras associadas à disseminação do vírus

como a barreira de escape do mesentério (BEM) e as de infecção (IGS) e escape (EGS) das glândulas salivares as quais são dependentes da dose de infecção inicial do mesentério (KRAMER e col. 1981).

A expressão dessas barreiras está influenciada por numerosos fatores tais como: características genéticas da população de mosquito, a nutrição do mosquito na fase larval, a cepa do vírus, a temperatura ambiental que afeta o período de incubação extrínseca e a existência de agentes endógenos no mosquito (HARDY 1988).

2.6 Efeito da infecção por arbovírus no mosquito.

Por muito tempo acreditou-se que as infecções por arbovírus não produziam efeitos deletérios nos artrópodes (DEFOLIART e col. 1987 e HARDY 1988). No entanto, estudos recentes mostraram que as infecções nos artrópodes podem não ser benignas. TURELL e col. (1985) e FARAN e col. (1988) mostraram que mosquitos *Culex pipiens* Linnaeus infectados com o vírus da febre de "Rift Valley" (RVFV) manifestaram redução na fecundidade e na habilidade para obter repasto sanguíneo, assim como, diminuição da sobrevivência na fase larval. Da mesma forma WEAVER e col. (1988) relataram lesões nas células epiteliais do mesentério de *Culiseta melanura* após a infecção com o EEEV. Entre as alterações foram mencionadas: a degeneração das células epiteliais do mesentério, a queda dos cílios da superfície das células epiteliais e a desagregação da lâmina basal (WEAVER e col. 1988).

MONCAYO e col. (2000) avaliaram o efeito da infecção com EEEV na sobrevivência de *Coquillettidia perturbans* (Walker), *Anopheles quadrimaculatus* Say e *Ae. albopictus*. Os autores mostraram que indivíduos de *Cq. perturbans* e *An. quadrimaculatus* infectados apresentaram diminuição na taxa de sobrevivência. No entanto, a sobrevivência dos indivíduos de *Ae. albopictus* infectados não foi afetada. Esses resultados são importantes se considerarmos que a sobrevivência é parâmetro importante para a avaliação da capacidade vetora de populações de culicídeos.

3. OBJETIVO GERAL

Tomando como base os trabalhos mencionados, o principal objetivo deste estudo é contribuir para o conhecimento da competência vetora e do efeito da infecção na longevidade de populações de *Ae. albopictus* do Brasil.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a suscetibilidade de duas populações de *Ae. albopictus*, coletadas em ambientes rural e urbano no Estado de São Paulo, para se infectar e transmitir DENV-1 e DENV-2.
2. Analisar o efeito da infecção, por aqueles vírus na longevidade dos mosquitos.
3. Avaliar a competência vetora das duas populações de *Ae. albopictus* para transmitir o subtipo epizootico IC e, enzoóticos ID e IF (vírus Mosso das Pedras) do VEEV.
4. Avaliar o efeito da infecção com o subtipo IC do VEEV na longevidade dos mosquitos.

4. JUSTIFICATIVA

Estudos que permitam conhecer a biologia e o comportamento de *Ae. albopictus* são importantes porque essa espécie se dispersou e se estabeleceu rapidamente no Hemisfério Ocidental. Acresce considerar que é altamente antropofílica, tem a capacidade de se estabelecer em ambientes rurais e urbanos e tem grande importância médica e veterinária por ser vetor potencial de agentes patogênicos.

Para o presente estudo foram empregadas populações de mosquitos coletadas em uma área rural, no Vale do Ribeira, e outra urbana, no Vale do Paraíba. As duas localidades apresentam diferenças no número de habitantes, na quantidade, distribuição e tipo de criadouros, assim como na temperatura e precipitação. Esses fatores podem gerar diferenças genéticas entre ambas as populações de mosquitos que podem determinar variabilidades biológicas e comportamentais, como por exemplo, a competência vetora e a longevidade. Não há registro do *Ae. aegypti* nem de casos clínicos de dengue nas duas localidades. Assim mesmo, pela habilidade que o *Ae. albopictus* apresenta para se adaptar às condições dos ambientes rural e urbano e pelo fluxo freqüente de pessoas de locais urbanos aos rurais, acredita-se que essa espécie possa eventualmente participar no ciclo de transmissão do DENV nesses ambientes. Acresce ressaltar que a infecção humana pelo DENV é de grande importância no Brasil porque tem afetado número elevado de pessoas.

Neste estudo foi avaliada a competência das populações de *Ae.*

albopictus para transmitir os subtipos IC, ID e o complexo IF do VEEV, considerando a elevada suscetibilidade dessa espécie para se infectar com o subtipo epizootico IAB daquele vírus (BEAMAN e TURELL 1991). Vale acrescentar, a proximidade do Brasil com a Colômbia e a Venezuela onde foram isolados subtipos epizooticos do VEEV (KUBES e RIOS 1939, SELLERS e col. 1965, WEAVER e col. 1996), a importância do subtipo ID como provável ancestral de subtipos epizooticos (RICO-HESSE e col. 1998 e WEAVER e col. 1992) e a escassa informação sobre o ciclo de transmissão do subtipo IF (CALISHER e col. 1982). Assim mesmo, é importante ressaltar a recente introdução de *Ae. albopictus* na Colômbia (VELEZ e col. 1998) e a possibilidade de que essa espécie possa eventualmente participar do ciclo de transmissão de subtipos epizooticos em localidades da Colômbia onde o vírus ocorre.

Existem evidências de que a infecção por arbovírus afeta a sobrevivência e produz efeitos deletérios nos mosquitos (TURELL e col. 1985, WEAVER e col. 1988, FARAN e col. 1987). Nesse sentido, torna-se imprescindível a realização de outros estudos que permitam entender melhor a associação do vírus com o inseto vetor. Por este motivo procurou-se avaliar o efeito da infecção por DENV-1 e DENV-2 e o subtipo IC do VEEV na sobrevivência de populações de *Ae. albopictus* do Estado de São Paulo.

5. CAPÍTULO I. COMPETÊNCIA VETORA DE POPULAÇÕES RURAL E URBANA DE *Ae. albopictus* DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL, PARA DENV-1 E DENV-2.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Áreas de estudo. Larvas de *Ae. albopictus* de terceiro e quarto estádios foram coletadas em recipientes artificiais, em localidades urbana e rural do Estado de São Paulo (Figura 1). A urbana corresponde à cidade de Pindamonhangaba, situada no Vale do Paraíba, ao Sudeste do Estado (22°55'50"S e 45°27'22"O). Apresenta altitude entre 551 a 580 metros, temperatura média anual de 17°C a 20°C, e precipitação média anual de 1.000 mm. A população é de 126.026 habitantes e as principais atividades econômicas são a agricultura, indústria e pecuária (SITE OFICIAL DE PINDAMONHANGABA 2003). Nessa cidade não foram registrados casos de dengue autóctone e o *Ae. albopictus* está amplamente distribuído no município, apresentando maior atividade no período de janeiro a maio, no horário da manhã (MARQUES e GOMES 1997). O *Ae. aegypti* tem sido registrado como focos esporádicos que foram controlados pelo serviço de vigilância ².

A localidade rural é a vila das Pedrinhas localizada no município de Ilha Comprida, na região do Vale do Ribeira, litoral Sul do Estado de São Paulo (23° 91'S e 47° 80'O). Dista, em linha reta, cerca de 16 Km da cidade

² SUCEN, com. pessoal

próxima de Cananéia. Esta Ilha encontra-se a poucos metros acima do nível do mar, apresenta extensão de 70 Km de comprimento e aproximadamente 3 km de largura. A temperatura média anual é de 24°C e a precipitação oscila entre 36 mm e 600 mm. A vila das Pedrinhas é um pequeno núcleo com cerca de 400 habitantes e 231 edificações, das quais 35% são ocupadas permanentemente, sendo o restante, habitações de veraneio. Em sua maior parte, a ilha é constituída por comunidades de caiçaras que mantêm suas culturas e sobrevivem de atividades artesanais. Na localidade não há registros de dengue nem da espécie *Ae. aegypti*. Porém, o *Ae. albopictus* se apresenta com grande densidade nos meses de janeiro a maio ao longo do dia (FORATTINI e col. 2000).

5.1.2 Linhagens de mosquitos. As larvas de *Ae. albopictus*, coletadas nas duas localidades mencionadas anteriormente, foram transportadas ao laboratório de Culicidologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, onde foram colocadas em bacias de metal com água destilada, cloreto de sódio e alimento (Tetramim®, Tetrawerke - Germany) para peixe. Os adultos que emergiram foram mantidos em estufa com temperatura que oscilou entre 26°C e 28°C, 70% a 80% de umidade relativa (UR) e fotoperíodo CE 12:12 horas.

Os adultos que emergiram foram alimentados diariamente com solução açucarada 10% e sangue humano duas vezes por semana para a obtenção de ovos. Os ovos da primeira geração foram transportados ao

laboratório de Patologia da “University of Texas Medical Branch (UTMB)” em Galveston (Texas, E.U.A.), onde foram mantidos em condições similares de laboratório para obter os ovos da F2. As fêmeas da geração F2 foram utilizadas nos experimentos de competência vetora e de longevidade.

5.1.3 Cepas do DENV. O Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, forneceu as cepas de DENV-1 (SPH 194762) e DENV-2 (SPH 194589) utilizadas nos experimentos. Ambas cepas foram isoladas no ano 2000 de soro de pacientes provenientes da cidade de Barretos, Estado de São Paulo. As amostras foram inoculadas em cultura de células de mosquito (*Ae. albopictus*) C6/36 uma única vez e os títulos iniciais foram 4.0 e 4.2 $\log_{10}$ TCID₅₀ ml⁻¹ para DENV-1 e DENV-2, respectivamente. As cepas virais foram diluídas 1:10 em meio mínimo essencial Eagles (MEM) [95% MEM, 10% soro fetal bovino (SFB), 1% solução de aminoácidos não-essencial, 10% Glutamina-Penicilina-Estreptomicina, 2,93% NaHCO₃], inoculadas em cultura de células C6/36 (clone de células Singh de *Ae. albopictus*) (IGARASHI 1978) e incubadas por 7-10 dias a 28°C. Após o período de incubação, as células foram separadas por agitação das paredes da garrafa e rompidas cuidadosamente no sobrenadante. Com o objetivo de concentrar e purificar as partículas virais, os inóculos de cada vírus foram transferidos para “beakers” mantidos no gelo. Acrescentou-se NaCl até concentração final de 2,3%, e P.E.G. (Polyethylene glycol 8000, Fisher Scientific) para concentração final de 7,0%,

que foram misturados de maneira lenta e constante. As soluções foram mantidas por 24 h a 4°C até a precipitação dos vírus. As partículas virais foram separadas por centrifugação por período de 30 min a 3.500 rpm e resuspensas em pequenos volumes do meio MEM (10% SFB).

Diluições seriadas de cada suspensão viral foram inoculadas em cultura de células C6/36 e incubadas a 28°C por 7 a 10 dias, seguindo o protocolo proposto pelo Dr. Robert Tesh da "UTMB". A infecção foi determinada pelo método de imunofluorescência (IFA) (TESH 1979). As células de cada diluição foram soltas e resuspensas no sobrenadante. Dez microlitros (10 µl) de cada diluição foram colocados em duplicata em lâminas de 12 poços. Foram usados fluídos ascíticos hiperimunes específicos, anti-dengue-1 "Hawaii MIAF" (diluição 1:40) e anti-dengue-2 "T34973 MIAF" (diluição 1:80). Foi utilizado conjugado fluoresceinado FITC (Sigma F-0257) diluído 1:15 em Azul de Evans (diluído 1:100 em PBS). As lâminas foram examinadas através do microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS 100 e o título de cada vírus foi determinado de acordo com versão modificada do método TCID₅₀ de Reed-Muench (HIERHOLZER e KILLINGTON 1996):

$\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50} = X - d(P - 0,5)$ onde,

X = log_{10} da maior concentração usada (menor diluição)

d = Log_{10} do fator de diluição

P = soma da porcentagem de mortalidade de células em cada diluição.

Os títulos dos vírus DENV-1 e DENV-2 foram 6,75 e 7,50 log_{10} TCID

50 ml⁻¹, respectivamente.

5.1.4 Experimentos de infecção dos mosquitos com as cepas do DENV. Duzentas fêmeas de cada localidade, com 4 a 6 dias de idade, foram selecionadas e transferidas para pequenas gaiolas, e mantidas sem alimento por 24 h antes do experimento. A solução sangue-vírus foi preparada de acordo com o seguinte protocolo: 0.1 ml de sacarose 10%, 0.233 ml de SFB, 0.33 ml de glóbulos vermelhos lavados de carneiro [0.65 ml de sangue de carneiro foi lavado três vezes com solução salina (PBS), 0.32 ml de meio de cultura de células (MEM) 10% SFB, e 0.025 ml ATP (Adenosine triphosphate)], e 0.33 ml da suspensão viral titulada.

A solução sangue-vírus foi colocada em aparelho Hemotek® - “5W1 Membrane Feeding System” cuja base foi coberta por membrana de pele de galinha e mantido em fluxo de água a 37°C na parte superior, simulando a temperatura corporal de mamíferos. Os mosquitos foram alimentados por período de uma hora e posteriormente anestesiados em frio (4°C) para selecionar os ingurgitados. Estes foram mantidos a 26°C e alimentados com solução açucarada 10% por 14 dias. O título da solução sangue-vírus, após a infecção, foi determinado pelo método IFA e comparado com o título inicial com o objetivo de saber se houve perda do título, na solução viral, durante o procedimento de infecção dos mosquitos.

5.1.5 Avaliação da infecção, disseminação e transmissão do DENV. Após período de 14 dias de incubação extrínseca, os mosquitos expostos à infecção pelas cepas de DENV, foram anestesiados em frio mantendo-os a 4°C por um período de 1 min. As pernas e as asas de cada exemplar foram removidas e as probóscides foram inseridas em tubos capilares de 10 µl que continham azeite mineral, por período de 30 - 40 min ou até observar gota de saliva no capilar. O capilar foi colocado em tubo eppendorf de 1,5 ml com 50 µl de meio MEM 10% SFB, centrifugado por 5 min a 4000 rpm e conservado a – 80° C.

A infecção e disseminação do vírus no mosquito foram avaliadas no corpo e nas pernas, respectivamente. Para isso, ambas partes de cada exemplar foram homogeneizadas separadamente em meio MEM 10% SFB, filtrados em filtros para seringa Acrodisc® (Gelman Laboratory – USA) e inoculados em cultura de células C6/36. Após 7 a 10 dias de incubação foi feito o teste IFA, usando os conjugados específicos, para detectar os vírus. As amostras originais daquelas que revelaram resultados positivos foram diluídas (1:10), inoculadas por triplicado em cultura de células C6/36 e tituladas pela técnica de IFA, segundo o método de Reed-Muench (HIERHOLZER e KILLINGTON 1996).

A saliva contida nos capilares foi analisada seguindo os mesmos procedimentos.

5.1.6 Avaliação da sobrevivência em mosquitos não expostos e expostos ao DENV. Seiscentos mosquitos de cada localidade foram selecionados para estes experimentos. De cada localidade, duzentos mosquitos foram artificialmente expostos à infecção com a cepa de DENV-1, duzentos com a cepa de DENV-2 e duzentos foram alimentados com solução de sangue sem vírus constituída por todos os reagentes mencionados no Item 5.1.4, colocando 0,33 ml de meio de cultura MEM no lugar da suspensão viral. Os mosquitos ingurgitados foram selecionados em frio (4°C) e mantidos a 26°C, 70-80% UR e alimentados com solução açucarada 10%. Os mosquitos foram observados diariamente e os mortos foram removidos, anotando-se a data da morte.

5.1.7 Análises estatísticas.

Para comparar as taxas de infecção, disseminação e transmissão entre as linhagens de mosquitos foram calculados o teste exato de Fisher e intervalos de confiança para as frequências observadas (SACHS 1984).

Com os dados obtidos dos experimentos de longevidade, foram construídas tabelas de vida para mosquitos expostos e não expostos aos vírus. Foi considerado que pelo menos 6,2% e 5,3% dos mosquitos do Vale do Paraíba e, 5,7% e 12% do Vale do Ribeira estavam infectados com DENV-1 e DENV-2, respectivamente, segundo os resultados obtidos nos experimentos de infecção.

Para cada caso foram definidas classes de idade, sendo a classe 1

equivalente a 0 a 5 dias, a classe 2 de 5 a 10 dias, e assim sucessivamente. Posteriormente, e seguindo as equações de KREBS (1999), foram calculadas a esperança de vida ($\hat{e}_0$), a variância média da esperança de vida, o desvio padrão, os intervalos de confiança e as curvas de sobrevivência.

A esperança de vida ao nascer para cada caso foi calculada da seguinte forma:

$$\hat{e}_0 = \frac{T_x}{n_x}$$

$$\text{onde, } T_x = \sum_{x=x}^{x=w} L_x \quad \text{e} \quad L_x = \frac{l_x + l(x+1)}{2}$$

onde l_x é a proporção de mosquitos vivos no início da classe de idade x e, $l(x+1)$, a proporção de mosquitos vivos ao início da classe seguinte de idade $x+1$; T_x é uma função acumulativa que representa o total de sobreviventes entre a idade x e a última idade w e n_x é o número total de mosquitos no início do experimento.

A variância do valor estimado $\hat{e}_0$ foi calculada da seguinte forma:

$$\text{var}(\hat{e}_0) = \sum_{x=0}^{m-1} \left[\frac{S_{x+1}^2 q_x}{p_x(n_x - 0.5ax)} \right]$$

sendo,

$$S_x = l_x + l_{x+1} + \dots + l_{m-1} + 0.5l_m$$

onde q_x é a taxa finita de mortalidade no intervalo de idade x a $x+1$; p_x é a taxa finita de sobrevivência no intervalo de idade x a $x+1$; ax é o número de mortes acidentais ou perdas de mosquitos no intervalo x a $x+1$; S_x é a taxa

de sobrevida e m é o número de classes de idade. A partir dessa variância foram obtidos os intervalos de confiança com 95% de significância da forma usual:

$$IC = \hat{e}_o \pm t_{\alpha}(DP)$$

onde t_{α} é o valor de t-Student para $(n-1)$ graus de liberdade e DP é o desvio padrão estimado como, $DP = \sqrt{\text{var}(\hat{e}_o)}$.

Simultaneamente foi utilizado o teste estatístico “log-rank” disponível no programa estatístico STATA 7.0 (STATA 2001), para avaliar a significância das diferenças das curvas de sobrevida obtidas em cada condição experimental (infectado e não infectado).

5.2 RESULTADOS

Os títulos das soluções sangue – vírus depois das infecções dos mosquitos foram 6,70 e 7,50 $\log_{10}$ TCID₅₀ ml⁻¹ para DENV-1 e DENV-2, respectivamente.

A suscetibilidade das populações rural e urbana de *Ae. albopictus* à infecção oral com DENV-1 e DENV-2 são mostradas na Tabela 1. As fêmeas do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira apresentaram taxas de infecção de 6,2% e 5,7% para DENV-1, e 5,3% e 12% para DENV-2 (Tabela 1). Apesar das diferenças entre os títulos nas suspensões infectantes 6,75 vs. 7,50 $\log_{10}$ TCID₅₀ ml⁻¹ para DENV-1 e DENV-2, respectivamente, as taxas de infecção dos exemplares da população urbana para as duas cepas do vírus foram similares. Já as fêmeas da população rural revelaram diferenças nessas taxas, sendo para DENV-1 50% menor do que para DENV-2.

No presente estudo foi possível detectar disseminação dos vírus através da hemocele do mosquito avaliando os homogeneizados das pernas pela técnica de IFA (como mencionado na seção 5.1.5 dos materiais e métodos). Porém, a transmissão dos vírus não foi detectada nas amostras de saliva coletadas (Tabela 1). Foram obtidas taxas de disseminação de 22.2% para DENV-1 e 40% para DENV-2 nos exemplares oriundos do Vale do Paraíba. Os mosquitos do Vale do Ribeira revelaram taxa de disseminação de 20% para DENV-2, mas não foi detectado o DENV-1 nas pernas dos mosquitos avaliados (Tabela 1).

O teste exato de Fisher não detectou diferenças significativas entre as

linhagens de *Ae. albopictus* avaliadas em relação às taxas de infecção e disseminação, para as duas cepas do DENV. Este resultado é corroborado ao observar a sobreposição entre os intervalos de confiança das taxas de infecção e disseminação (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra a média dos títulos de infecção e disseminação dos vírus DENV-1 e DENV-2, determinados na inoculação dos corpos e pernas dos mosquitos, respectivamente, nas células C6/36. Esses valores foram maiores nos mosquitos do Vale do Paraíba, mas a diferença não é estatisticamente significativa.

As Figuras 2A e 2B mostram as curvas de sobrevivência dos mosquitos de *Ae. albopictus* de cada localidade, expostos e não expostos à infecção pelos vírus DENV-1 e DENV-2. As curvas dos mosquitos expostos e não expostos apresentaram tendências similares, assim como os valores da esperança de vida (e_0) expressados na Tabela 3. Essa observação foi confirmada pelo teste de “log-rank” e pela sobreposição dos intervalos de confiança.

5.3 DISCUSSÃO

No presente estudo foram encontradas baixas taxas de infecção e disseminação dos vírus DENV-1 e DENV-2 nas linhagens de *Ae. albopictus* avaliadas. Esses resultados não eram esperados considerando-se que os títulos utilizados na infecção artificial foram elevados e comparáveis àquele de $5.5 \log_{10}$ TCID₅₀/ml usado por MILLER e BALLINGER (1988).

É importante considerar que neste estudo foram usadas as segundas gerações das populações de *Ae. albopictus*, enquanto que, MILLER e BALLINGER (1988) utilizaram nos experimentos exemplares dessa espécie mantidos em condições de laboratório por longo período. Segundo LORENZ e col. (1984) é recomendado usar mosquitos do campo ou mantidos no laboratório por poucas gerações, pois dessa maneira os resultados se aproximam mais da realidade. Os efeitos imprevisíveis, na suscetibilidade e transmissão de vírus, em mosquitos mantidos por longo tempo em insetário e infectados em condições de laboratório foram também mencionados em outros trabalhos (GRIMSTAD e col. 1977, GARGAN e col. 1983, VAZEILLE e col. 2003)

Inicialmente, as cepas virais foram inoculadas em cultura de células C6/36 sem serem manipuladas. No entanto, os títulos obtidos foram baixos e foi necessário utilizar a técnica de precipitação por P.E.G. com o objetivo de concentrar as partículas virais e aumentar os títulos das suspensões de vírus. Provavelmente, as cepas testadas apresentaram baixa infectividade o que pode ter afetado os resultados dos experimentos de infecção dos

mosquitos. A variabilidade na infectividade entre cepas do DENV foi observada e mencionada anteriormente por GUBLER e ROSEN (1976) e ARMSTRONG e RICO-HESSE (2001).

Pesquisadores têm mencionado que as taxas de infecção para diferentes arboviroses são menores em mosquitos infectados oralmente com suspensões virais, em comparação com aqueles infectados diretamente em hospedeiros virêmicos, mesmo que os títulos de infecção sejam semelhantes (MITCHELL, 1983). Isto pode ser atribuído ao volume e qualidade dos eritrócitos utilizados na suspensão sangue-vírus (VAZEILLE-FALCOZ e col. 1999), e à falta de coagulação e concentração das partículas virais nas adjacências do epitélio do mesentério após a ingestão da suspensão (WEAVER e col. 1993).

No presente estudo, tanto a baixa infectividade das cepas virais utilizadas, quanto o uso de infecção artificial, podem ter determinado as baixas taxas de infecção obtidas. Apesar dos vírus terem se disseminado pelo corpo dos mosquitos (com exceção dos mosquitos do Vale do Ribeira e o DENV-1), estes não foram detectados nas salivas coletadas. Provavelmente, as populações de *Ae. albopictus* testadas apresentam barreira à infecção nas glândulas salivares que impediu que os vírus se replicassem nesses tecidos. Segundo HARDY e col. (1983) essas barreiras são determinadas pela concentração inicial do vírus na hemolinfa. Por outro lado, os vírus podem ter chegado às glândulas salivares, mas não foram detectáveis pelas técnicas usadas porque se apresentaram em baixas

concentrações. Provavelmente, os mosquitos do Vale do Ribeira não disseminaram o DENV-1 porque a taxa de infecção foi muito baixa ou, porque os exemplares avaliados apresentaram barreira à infecção no mesentério.

O DENV é comumente isolado, inoculando-se as amostras de interesse, em mosquitos adultos *Ae. albopictus* ou *Ae. aegypti* ou *Toxorhynchites amboinensis* (Doleschall). Usa-se também o isolamento em culturas de células de mosquito. A identificação do vírus nesses sistemas pode ser feita pela técnica de IFA, pelo teste de fixação de complemento e, mais recentemente, pela reação em cadeia de polimerase (PCR). TESH (1979) demonstrou que a inoculação em mosquitos é mais sensível na detecção do DENV em comparação com as culturas celulares. O autor mencionou que os títulos medidos em *Tx. amboinensis* foram 100 a 1000 vezes maior quando comparados com àqueles detectados em culturas celulares. Da mesma forma, acredita-se que a técnica PCR é mais sensível do que as técnicas de IFA e de fixação de complemento na identificação do sorotipo do vírus. Neste estudo, as pernas, corpos e saliva dos mosquitos expostos aos vírus foram inoculados em culturas de células C6/36 e, a detecção dos sorotipos foi feita pela técnica de IFA.

LOURENÇO DE OLIVEIRA e col. (2003) mencionaram a importância de utilizar as mesmas condições experimentais (geração da população de mosquitos, período de incubação, titulação do vírus, história de passagem dos vírus) ao avaliar e comparar as taxas de infecção. Assim mesmo, é

recomendado o uso de população controle de mosquito que revele taxas de infecção homogêneas. Isto não foi feito neste estudo e acredita-se que houvesse sido importante para avaliar a infectividade do vírus, mas não para avaliar a suscetibilidade à infecção das populações coletadas no campo. Como mencionado anteriormente, foi demonstrado que as taxas de infecção incrementam com o número de gerações dos mosquitos no laboratório (LORENZ e col. 1984, VAZEILLE e col. 2003).

As linhagens de *Ae. albopictus* avaliadas não revelaram a presença dos vírus na saliva. No entanto, deve-se considerar que os dados apresentados não dizem respeito ao comportamento do mosquito nas condições do campo. Dessa maneira, a suscetibilidade dos mosquitos pode ser diferente se picarem humano virêmico. Assim mesmo, é importante mencionar que os machos de *Ae. albopictus* poderiam eventualmente transmitir o vírus por via sexual (ROSEN 1987) e que as fêmeas poderiam transmiti-lo à progênie por via vertical (ROSEN e col. 1983). Cabe ressaltar que outros fatores tais como, a densidade e sobrevivência desses insetos são também relevantes para a determinação da capacidade vetora.

Não foram encontradas diferenças significativas, nas porcentagens de infecção e disseminação das cepas do DENV, entre as linhagens de *Ae. albopictus* estudadas. Porém, experimentos com exemplares de outras localidades ou sob condições experimentais diferentes devem ser realizados com o objetivo de complementar as informações obtidas.

A longevidade das linhagens de *Ae. albopictus* empregadas no

presente estudo parece não ter sido afetada pela infecção com os vírus. No entanto, é importante considerar que isso pode ter sido consequência das baixas taxas de infecção dos mosquitos. Deve-se ter em mente que a longevidade é fator importante para a avaliação da capacidade vetora de populações de insetos, portanto, este tópico deve ser reavaliado no futuro.

5.4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem-nos concluir o que segue:

1. As linhagens de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira mostraram baixa suscetibilidade à infecção pelos vírus DENV-1 e DENV-2. Esses resultados não eram esperados considerando que os títulos das cepas virais foram elevados. Portanto, acredita-se que os resultados podem ter sido afetados pela baixa infectividade dos vírus testados, pelo fato de ter infectado os mosquitos artificialmente, pela inoculação das amostras em cultura de células C6/36 e pela detecção dos vírus pela técnica IFA.
2. Os exemplares de *Ae. albopictus* do Vale do Ribeira disseminaram o DENV-2 mas não disseminaram o DENV-1. Provavelmente, a taxa de infecção desse vírus foi muito baixa ou, os mosquitos avaliados apresentaram barreira à infecção no mesentério. Os indivíduos testados não mostraram competência para transmitir o DENV-2.
3. Os exemplares de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba disseminaram as duas cepas de DENV avaliadas. No entanto, não se mostraram competentes para transmiti-las.
4. Provavelmente, as duas linhagens apresentaram barreiras à infecção nas glândulas salivares ou, os vírus não foram detectados pela técnica IFA. Vale ressaltar que esses resultados não dizem respeito ao comportamento desses mosquitos em condições naturais.
5. A longevidade das linhagens de *Ae. albopictus* avaliadas não foi

afetada pela infecção pelas cepas do DENV usadas no presente estudo. No entanto, deve-se considerar que as taxas de infecção dos mosquitos foram baixas.

TABELAS

Tabela 1. Porcentagens de infecção e disseminação em exemplares de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira expostos ao DENV-1 e DENV-2

linhagem de mosquito	DENV (a)	Taxa de Infecção ^(b)	Taxa de Disseminação ^(c)
Vale do Paraíba	1	9/145 (6.2) (3.0 – 11.0)	2/9 (22.2) (3.0 – 60.0)
	2	5/94 (5.3) (2.0 – 12.0)	2/5 (40) (5.0 – 85.0)
Vale do Ribeira	1	4/70 (5.7) (2.0 – 13.4)	0/4 (0) n.c.*
	2	10/84 (12) (6.0 – 20.0)	2/10 (20) (7.3 – 56.0)

^(a) Titulação viral do sangue: DENV-1 = 6,75 log₁₀ TCID₅₀/ml; DENV-2 = 7,50 log₁₀ TCID₅₀/ml

^(b) Número infectados / número testados (porcentagem de infectados) (95% IC)

^(c) Número disseminados / número infectados (porcentagem de disseminação) (95% IC)

*n.c.= não calculado

Tabela 2. Média dos títulos ($\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$) de infecção e disseminação do DENV-1 e DENV-2 em exemplares de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira.

Linhagem de mosquito	Cepa do DENV	Título da infecção	Título da disseminação
Vale do Paraíba	1	5.4	5.25
	2	5.88	2.95
Vale do Ribeira	1	2.4	n.d.*
	2	3.96	2.85

* n.d.= não determinado

Tabela 3. Esperança média de vida ($\hat{e}_0$) das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira não expostas e expostas ao DENV-1 e DENV-2.

Linhagem mosquito	$\hat{e}_0^{(a)} (\hat{e}_0 \pm t_{\alpha} DP^{*})^{(b)}$		
	Não exposta	Exposta DENV-1	Exposta DENV-2
Vale do Paraíba	27.88 (25.78 – 26.97)	22.10 (18.90 – 25.30)	28.15 (25.19 – 31.11)
Vale do Ribeira	23.85 (21.44 – 26.26)	20.56 (18.52 – 22.60)	21.50 (18.54 – 24.46)

^(a) Estimado em dias

^(b) Intervalo de confiança; * DP = Desvio padrão

FIGURAS

Figura 1. Localização do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira nos Estados de São Paulo e Paraná. Ampliação da área de coleta no Vale do Ribeira.

Figura 2A. Curvas de sobrevivência (Sx) das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba não expostas e expostas ao DENV-1 e DENV-2.

Figura 2B. Curvas de sobrevivência das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Ribeira não expostas e expostas ao DENV-1 e DENV-2.

6. CAPÍTULO II: COMPETÊNCIA VETORA DE POPULAÇÕES RURAL E URBANA DE *Ae. albopictus* DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL, PARA OS SUBTIPOS IC, ID E COMPLEXO IF DO VEEV.

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados relativos às áreas de estudo, obtenção e manutenção das linhagens de mosquito em condições de laboratório foram mencionados no Capítulo I.

6.1.1 Cepas do VEEV. As cepas virais, IC, ID e IF foram fornecidas pelo Centro de Referência Mundial de Arbovírus da “UTMB”. As fontes dos vírus, títulos e história de passagens são mostradas na Tabela 4. Em laboratório de segurança de nível 3, as cepas foram inoculadas em cultura de células Vero e incubadas a 37°C até observar efeito citopático (aproximadamente 3-4 dias).

Posteriormente os vírus foram titulados pelo método de ensaio de placas. As células foram soltas e misturadas no sobrenadante, diluídos (1:10) em meio MEM (95% MEM, 5% SFB, 10% Glutamina-Penicilina-Estreptomicina, 2,93% NaHCO₃) e cada diluição foi acrescentada em pratos de seis escavações (Corning®). Os pratos foram incubados a 37°C por 1 h, sendo agitados a cada 15 min. Após 1 h de incubação, foram acrescentados

4 ml de meio MEM (5% SFB) misturado com agarose 4%. Os pratos foram incubados a 37°C por aproximadamente três dias ou até se observar formação de placas brancas no fundo das escavações. Ao se observar placas acrescentou-se formaldeído 10% em cada poço por 10-15 min, inativando assim os vírus. Posteriormente, foi adicionado volume suficiente de violeta cristal, para cobrir as escavações e para corar as placas. Os pratos foram lavados em água fresca, secos ao ar livre e as placas foram contadas.

O título de infecção é expresso como o número de unidades formadoras de placas por ml (PFU/ml) que foi obtido da seguinte forma:

Número de placas x recíproco da diluição x recíproco do volume em mililitros (HIERHOLZER e KILLINGTON, 1996).

Com o objetivo de estimar o tempo de incubação necessário para gerar viremia de 10^6 PFU/ml, similar à gerada em cavalos infectados na natureza, camundongos "Swiss NIH" de 6-8 semanas de idade foram inoculados via subcutânea, por duplicata, com 0,1 ml de uma amostra de cada cepa do VEEV que expressava 100 PFU/ml. Os camundongos foram sangrados na veia safena 12, 16, 24 e 36 h após a inoculação. Volume de 20 µl de cada amostra foi diluído em 180 µl de meio MEM (5% SFB) e posteriormente titulado em células Vero pelo método de ensaio de placas (Figura 3).

6.1.2 Experimentos de infecção dos mosquitos com o VEEV.

Foram selecionadas cem fêmeas de cada localidade, com 4-6 dias de idade, para serem expostas à infecção pelos subtipos IC e ID, e 50 fêmeas para o subtipo IF do VEEV. As fêmeas foram colocadas em gaiolas pequenas e mantidas sem alimentação por período de 24 h antes do experimento.

Camundongos virêmicos (expressando 10^6 PFU/ml) foram anestesiados com Nembutal e colocados sobre as gaiolas. Permitiu-se que as fêmeas dos mosquitos se alimentassem por período de 1 h. Os mosquitos ingurgitados foram colocados em estufa mantida a 26°C e 70-80% UR, e alimentados com solução açucarada 10% por 14 dias. Paralelamente, foram retirados 20 µl de sangue dos camundongos por punção cardíaca que foram diluídos em 180 µl de meio MEM 5% para análise do título pelo método de ensaio de placas.

6.1.3 Avaliação da infecção, disseminação e transmissão do VEEV. Após 14 dias de incubação, as pernas de cada mosquito foram removidas e estocadas a -80°C para ensaios virais. A saliva de cada exemplar foi coletada em tubos capilares que continham azeite mineral. Cada amostra de saliva foi diluída em 150 µl de meio MEM (5% SFB e 0,56% Amphotericina B) e centrifugada a 5000 rpm por 6 min. Um volume de 20 µl de cada amostra de saliva foi inoculado por via intracerebral em camundongos recém nascidos de 3-4 dias de idade. Esses foram observados diariamente e os que adoeceram ou morreram foram

considerados positivos à infecção pelos vírus. Este método é extensivamente usado no isolamento de arbovírus (TRAVASSOS DA ROSA e col. 1992). Os exemplares que foram comidos pela mãe antes de serem colhidos, também foram considerados positivos, pois o canibalismo é comportamento “normal” nesses animais quando a mãe percebe que o filhote está doente ou com alguma anomalia.

Os cérebros dos camundongos moribundos recuperados das gaiolas foram macerados em meio MEM (5% SFB e 0,56% de Amphotericina B), centrifugados e titulados em células Vero pelo método de ensaio de placas. Os corpos e as pernas dos mosquitos foram processados da mesma forma para avaliar a infecção e disseminação dos vírus, respectivamente.

6.1.4 Avaliação da sobrevivência em mosquitos expostos à infecção pelo subtipo IC do VEEV. Duzentas fêmeas de cada localidade, de 4-6 dias de idade foram selecionadas e colocadas em gaiolas. Cem delas realizaram hematofagia em camundongo infectado com a cepa IC do VEEV, enquanto as outras cem fêmeas, se alimentaram em camundongo não infectado. Os mosquitos foram anestesiados a 4°C por 1 min e os ingurgitados foram selecionados e mantidos a 26°C, 70% - 80% UR e alimentados com solução açucarada 10%. Os exemplares mortos foram removidos da gaiola e foi feita a anotação da data da morte. Tabelas de vida foram construídas para cada condição experimental (não infectados e infectados com o VEEV). Nesta experiência foi considerado que pelo menos

76% dos mosquitos do Vale do Paraíba e 96% dos mosquitos do Vale do Ribeira estavam infectados, de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de infecção.

6.1.5 Análises estatísticas. Foram utilizados os mesmos procedimentos mencionados no Capítulo I.

6.2 RESULTADOS

A Figura 3 mostra os títulos de viremia dos camundongos em função do tempo, após a inoculação das cepas virais. Camundongos infectados com o subtipo IC 243937 desenvolveram, em média, título de 10^5 PFU/ml no período entre 16 e 24 h após a inoculação do vírus. Os camundongos infectados com o subtipo ID 66637 desenvolveram título similar, após 16 h e, os infectados com o subtipo IF 78V3531, após 24 h. Esses intervalos de incubação foram selecionados para os experimentos de infecção e se aproximaram dos valores encontrados na natureza em humanos, eqüinos e roedores silvestres (WEAVER 1998).

Elevada porcentagem dos mosquitos das duas localidades mostrou-se suscetível à infecção pelas cepas IC e ID do VEEV, todavia as taxas de infecção para o subtipo IF foram baixas (Tabela 5). A taxa de infecção para o subtipo IC foi significativamente maior ($\chi^2 = 5,27, df=1$; $P < 0,05$) na população rural de *Ae. albopictus*, porém, as de disseminação e de transmissão foram similares nas duas linhagens de mosquito. Não foram detectadas diferenças significativas entre as duas linhagens nas taxas de infecção, disseminação e transmissão dos diferentes subtipos.

Os títulos dos vírus detectados no sangue extraído do coração dos camundongos, após o experimento de infecção dos mosquitos foram 5.0, 4.6 e 4.7 $\log_{10}$ PFU para IC, ID e IF, respectivamente.

Na Tabela 6 são mencionados os títulos de infecção e transmissão determinados nos corpos e nas amostras de saliva coletadas,

respectivamente, para os subtipos avaliados. Os títulos de transmissão oscilaram em média entre $10^{5.8}$ e $10^{6.2}$ para o subtipo IC, entre $10^{5.8}$ e $10^{6.0}$ para o subtipo ID e, entre $10^{5.0}$ e $10^{5.3}$ para o subtipo IF, nos exemplares de *Ae. albopictus*. Esses valores não foram estatisticamente diferentes entre as linhagens estudadas.

A Figura 4 representa as curvas de sobrevivência de *Ae. albopictus* das duas localidades após terem ingerido sangue de camundongos não infectado e infectado com o subtipo IC do VEEV. As curvas mostram diferenças entre mosquitos não infectados e infectados, mas não entre as populações avaliadas. Os intervalos de confiança apresentados na Tabela 7 confirmaram esta observação, pois não há sobreposição entre eles quando comparamos mosquitos não infectados e infectados, mas sim entre as populações. Da mesma forma, o teste “log-rank” ($\chi^2 = 122.41$; $P > 0.000$) apoiou a hipótese de que a infecção pelo subtipo IC do VEEV diminui a sobrevivência dos mosquitos.

6.3 DISCUSSÃO

A suscetibilidade à infecção pelos subtipos IC, ID e IF do VEEV mostrada pelos exemplares de *Ae. albopictus* das localidades avaliadas complementou os resultados mencionados por BEAMAN e TURELL (1991). Os autores relataram elevada susceptibilidade dos exemplares de *Ae. albopictus* oriundos do Estado de Espírito Santo para o subtipo IAB do VEEV.

Apesar de que as duas linhagens mostraram baixas taxas de infecção para o subtipo IF, os títulos foram comparáveis àqueles detectados nos mosquitos infectados com os subtipos IC e ID. Esses dados indicam que provavelmente alguns dos mosquitos testados possuem barreira à infecção no mesentério (MIB) para o subtipo IF (HARDY e col. 1983).

TURELL (1999) obteve, em condições de laboratório, taxas de infecção e disseminação de 94% e 89%, respectivamente, e detectou transmissão para o subtipo IC do VEEV, em exemplares de *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann). Essas taxas são comparáveis às mencionadas na Tabela 6.

Mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Deinocerites* estão envolvidos no ciclo de transmissão dos subtipos epizoóticos do VEEV. *Psorophora confinnis* e *Ae. taeniorhynchus* são considerados vetores do subtipo IAB do VEEV (WEAVER 1998). *Culex (Melanoconion) aikenii* sensu lato (*Culex ocossa* Dyar & Knab e *Culex panocossa* Dyar) é considerado vetor enzoótico do subtipo ID do VEEV no Panamá (GALINDO e GRAYSON

1971). WALDER e col. (1984) assinalaram que na Venezuela foram isoladas cepas enzoóticas do VEEV, em mosquitos das espécies *Aedes fulvus* (Wiedemann) e *Cx. (Mel.) ferrerii* Duret e, em Iquitos, Peru, espécimes de *Cx. (Mel.) gnomatos* Sallum, Hutchings & Ferreira e de *Cx. (Mel.) vomerifer* Komp foram encontrados naturalmente infectados com o subtipo ID (TURELL e col. 2000). As elevadas taxas de infecção (91%), disseminação (65%) e transmissão (53%) relatadas para essas espécies são comparáveis às mencionadas para *Ae. albopictus* na Tabela 6.

Neste estudo, não foi possível quantificar o vírus nos camundongos recém nascidos inoculados com a saliva dos mosquitos infectados com IF, porque a mãe comeu os filhotes antes de serem analisados. No entanto, CALISHER e col. (1982) mencionaram que o subtipo IF não é virulento para os camundongos com até 6-8 semanas de idade. Provavelmente, seja necessário utilizar outro procedimento em trabalhos futuros para avaliar a transmissão desse subtipo.

O estudo feito por MONCAYO e col. (2000) mostrou que a infecção de *Ae. albopictus* pelo vírus EEEV não afetou a sobrevivência da população analisada. No presente estudo, a infecção pela cepa 243937 do subtipo IC do VEEV diminuiu a sobrevivência das duas populações de *Ae. albopictus* avaliadas.

6.4 CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos realizados permitiram as seguintes conclusões, a saber:

1. As linhagens de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira mostraram competência para transmitir os subtipos IC e ID do VEEV. As taxas de infecção, disseminação e transmissão foram comparáveis àquelas relatadas na literatura para espécies de mosquito consideradas vetores naturais desses subtipos. Não foram detectadas diferenças significativas entre as duas populações em relação às taxas de infecção, disseminação e transmissão desses subtipos do VEEV.
2. Os exemplares de *Ae. albopictus* avaliados mostraram baixas taxas de infecção pelo subtipo IF do VEEV, porém, as de disseminação foram elevadas nas duas populações. Acredita-se que alguns dos indivíduos das populações testadas apresentaram barreiras à infecção no mesentério.
3. Os títulos de infecção para os três subtipos foram elevados e comparáveis entre si, portanto, acredita-se que as linhagens estudadas sejam suscetíveis à infecção pelos subtipos IC, ID e IF do VEEV.
4. A sobrevivência das linhagens estudadas de *Ae. albopictus* foi afetada pela infecção com o subtipo IC do VEEV. Nesse sentido, é questionada a possibilidade dessas populações serem vetores na

natureza. Não foram detectadas diferenças significativas na longevidade entre as fêmeas do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira.

TABELAS

Tabela 4. Fonte, história de passagens e título dos subtipos IC, ID e IF do VEEV.

Subtipo	Fonte	Localidade	Ano	História de passagens	Título (PFU/ml)
IC 243937	Cavalo	Estado Trujillo, Venezuela	1992	Duas vezes em camundongo	$10^{6,5}$
ID 66637	Hamster	Estado Zulia, Venezuela	1981	Uma vez em células Vero	10^7
IF78V3531	Mosquito	Estado São Paulo, Brasil	1976	Uma vez em células Vero	$10^{5,3}$

Tabela 5. Porcentagens de infecção, disseminação e transmissão em exemplares de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira expostos aos subtipos IC, ID e IF do VEEV.

Linhagem mosquito	VEEV Subtipo	Taxa de Infecção ^(a)	Taxa de Disseminação ^(b)	Taxa de Transmissão ^(c)
Vale do Paraíba	IC	28/37 (75.7)	25/28 (89.3)	21/28 (75.0)
		(59-88)	(72-98)	(85-89)
	ID	26/34 (76.5)	25/26 (96.2)	18/26 (69.2)
		(58-89)	(80-100)	(48-86)
	IF	6/22 (27.3)	6/6 (100)	2/6 (33.3)
		(11-61)	(100-100)	(4-78)
Vale do Ribeira	IC	27/28 (96.4)	26/27 (96.3)	20/27 (74.1)
		(82-100)	(81-100)	(54-89)
	ID	28/36 (77.8)	26/28 (92.9)	26/28 (92.9)
		(61-90)	(81-100)	(76-99)
	IF	3/10 (30)	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)
		(7-65)	(9-99)	(9-99)

(*) Titulação viral do sangue: IC= 5.03 +/- 0.4 log₁₀ PFU; ID= 4.6 +/- 0.8 log₁₀ PFU; IF= 4.8 +/- 0.1 log₁₀ PFU

^(a) Número de infectados / número testados (porcentagem de infectados) (95% IC)

^(b) Número disseminados / número infectados (porcentagem de disseminação) (95% IC)

^(c) Número transmitiram / número infectados (porcentagem de transmissão) (95% IC).

Tabela 6. Média dos títulos ($\log_{10}$ PFU/ml) de infecção e transmissão dos subtipos de VEEV em exemplares de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira.

Linhagem mosquito	IC 243937		ID 66637		IF 78V3531
	Inf. ^(a)	Trans. ^(b)	Inf.	Trans.	Inf. (*)
Vale do Paraíba	6.20+/-0.63	7.54 +/- 0.93	5.82+/-0.86	7.57+/-1.72	5.34+/-0.50
Vale do Ribeira	5.83+/-0.56	8.54 +/- 0.83	5.95+/-0.63	7.74+/-0.93	5.04+/-0.77

^(a) Inf = Infecção.

^(b) Trans = Transmissão

(*) Os títulos de transmissão não foram determinados porque a mãe comeu os filhotes

Tabela 7. Esperança média de vida ($\hat{e}_0$) das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira, não infectadas e infectadas com VEEV IC 243937.

Linhagem mosquito	$\hat{e}_0^{(a)} (\hat{e}_0 \pm t_{\alpha} DP^{*})^{(b)}$	
	Não infectado	Infectado
Vale do Paraíba	27.88 (25.78 – 26.97)	12.50 (11.02 – 13.98)
Vale do Ribeira	23.85 (21.44 – 26.26)	12.90 (11.48 – 14.32)

^(a) Estimado em dias

^(b) Intervalo de confiança;

* DP = desvio padrão

FIGURAS

Figura 3. Viremia dos camundongos Swiss NIH infectados com 100 PFU dos subtipos IC, ID e IF do VEEV.

Figura 4. Curvas de sobrevivência (Sx) das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira não infectadas e infectadas com o subtipo IC 243937 VEEV.

VP =Vale do Paraíba; VR = Vale do Ribeira.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aedes albopictus é espécie de grande importância epidemiológica no Brasil porque foi introduzido recentemente e está se dispersando ampla e rapidamente para os diferentes estados. Além disso, apresenta a capacidade para se estabelecer em ambientes rural e urbano, é altamente antropofílica e pode ser vetor potencial de múltiplos arbovírus e parasitas que acometem a população humana, tais como os vírus da febre amarela e da dengue, e de canídeos, como a dirofilariose.

Os experimentos de competência vetora realizados no presente estudo revelaram resultados importantes em relação à suscetibilidade de linhagens de *Ae. albopictus* de uma localidade urbana, do Vale do Paraíba e de outra rural, do Vale do Ribeira, ambas do Estado de São Paulo, para se infectar pelos vírus DENV e VEEV e à competência para transmiti-los.

A baixa suscetibilidade à infecção pelo DENV detectada nas duas linhagens foi provavelmente devido à baixa infectividade dos vírus testados, à técnica de infecção artificial dos mosquitos e às técnicas de inoculação e detecção dos vírus. Provavelmente, o uso de população controle de mosquito houvesse permitido esclarecer algumas destas questões.

Na vila de Pedrinhas não há relatos de casos de dengue nem de *Ae. aegypti*. Porém, o *Ae. albopictus* se apresenta freqüentemente com maior densidade nos meses de janeiro a maio, período em que a ilha costuma receber elevado número de turistas que procedem de diferentes localidades do Estado onde geralmente há ocorrência de algum dos sorotipos do DENV.

Na cidade de Pindamonhangaba não há relatos de casos de dengue e o *Ae. aegypti* se apresenta como focos esporádicos. No entanto, o *Ae. albopictus* é freqüentemente observado ao longo do ano apresentando-se com maior densidade nos meses de verão quando as temperaturas e a pluviosidade são elevadas (MARQUES e GOMES 1997). A cidade apresenta um fluxo constante de pessoas ao longo do ano devido às atividades econômicas desenvolvidas pela população, e conseqüentemente, de cepas do DENV. Vale acrescentar o assinalado por ROSEN e col. (1983) e ROSEN (1987) em relação à habilidade do *Ae. albopictus* para transmitir sexual e verticalmente o DENV na natureza. Sendo assim, outros estudos de competência e de capacidade vetora devem ser conduzidos de maneira a esclarecer e acrescentar informações às reveladas nesta pesquisa.

A pesquisa efetuada com o VEEV e as linhagens rural e urbana do *Ae. albopictus* revelaram resultados importantes em relação à competência vetora dessas populações para os três subtipos avaliados do vírus. Como foi mencionado anteriormente, no Brasil não ocorrem subtipos epizooticos do VEEV. Porém as duas linhagens estudadas revelaram elevadas taxas de infecção e de transmissão para o subtipo IC, chamando assim a atenção para a eventual ocorrência desse subtipo no Brasil considerando a proximidade de países onde têm acontecido epidemias, recentemente. As duas linhagens de mosquito avaliadas parecem apresentar BIM para o subtipo IF, apesar disso, as taxas de disseminação do vírus foram elevadas. O *Cx. (Mel.) sp.* é assinalado como o possível vetor desse vírus, mas

acredita-se que estudos de campo e de laboratório serão necessários para esclarecer o ciclo natural desse subtipo do VEEV.

A diminuição na taxa de sobrevivência das fêmeas de *Ae. albopictus* infectadas com o subtipo epizootico IC do VEEV observada neste estudo é importante, devido à possibilidade dessa espécie ser vetor potencial desse vírus. Nesse sentido, será necessário realizar outros estudos que analisem outras variáveis relacionadas com a longevidade e o efeito do vírus, como por exemplo, na produção de ovos, possibilidade de danos nos tecidos do mesentério e glândulas salivares, entre outras.

Para finalizar, vale ressaltar que o conceito de competência vetora deve ser analisado de maneira dinâmica, porque esta característica é predeterminada por fatores genéticos e por variáveis exógenas como, por exemplo, a temperatura ambiental e as condições de alimentação do mosquito na fase larval (HARDY e col. 1983). Avaliações do efeito dessas variáveis na competência vetora de populações de *Ae. albopictus* do Brasil devem ser feitas, principalmente com o DENV, já que este flavivirus está afetando seriamente a população humana em diferentes regiões do território brasileiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Armstrong PM, Rico-Hesse R. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. **Vector Borne and zoonotic diseases** 2001; 1(2): 159-68
- 2- Ayres CFJ, Romão TPA, Melo-Santos MAV, Furtado AF. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 2002; 97(6): 871-5.
- 3- Beaman JR, Turell MJ. Transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected in North and South America. **J. Med. Entomol.** 1991; 28(1): 161-4.
- 4- Black WC IV, Ferrari JA, Rai KS, Sprenger D. Breeding structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* (Skuse) in the United States. **Heredity**. 1988a; 60: 173-81.
- 5- Black WC IV, Hawley WA, Rai KS, Craig GB JR. Breeding structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* in peninsular Malaysia and Borneo. **Heredity** 1988b; 61: 439-46.
- 6- Birungi J, Munstermann LE. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 2002; 95(1): 125-32.
- 7- Black IV WC, Ferrare JA, Rai KS. Sprenger D. Breeding structure of a

- colonizing species: *Aedes albopictus* (Skuse) in the United States. **Heredity** 1988a; 60: 173-84.
- 8- Black IV WC, Hawley WA, Rai KS, Craig Jr GB. Breeding structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* (Skuse) in peninsular Malaya and Borneo. **Heredity** 1988b; 61: 439-46.
- 9- Borges SM dos A A. **Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas**. São Paulo; 2001 [Tese de Mestrado-Faculdade de Saúde Pública da USP].
- 10-Boromisa RD, Rai KS, Grimstad PR. Variation in the vector competence of geographic strains of *Aedes albopictus* for dengue 1 virus. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1987; 3(3): 378-86.
- 11-Broche RG, Borja EM. *Aedes albopictus* in Cuba. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1999; 15(4): 569-70.
- 12-Calisher CH, Shope RE, Brandt W, Casals J, Karabatsos N, Murphy FA, Tesh RB, Wiebe ME. Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. Togaviridae, Alphavirus. **Intervirology**. 1980; 14: 229-32.
- 13-Calisher CH, Kinney RM, De Souza Lopes O, Trent DW, Monath TP, Francly DB. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1982; 31(6): 1260-72.
- 14-Cardoso Junior RP, Scandar SAS, Mello NV, Ernandes S, Botti MV, Nascimento EMM. Detecção de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, na zona urbana do município de Catanduva-SP, após controle de

- epidemia de dengue. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 1997; 30(1):37-40.
- 15-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).
***Aedes albopictus* introduction in Texas.** MMWR. 1986. 35: 141-2.
- 16- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).
2000. **Information on *Aedes albopictus*.**
http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/albopic_new.htm
- 17-Chiaravalloti Neto F, Costa AIP, Soares MRD, Scandar SAS, Cardoso Junior RP. Descrição da colonização de *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) na região de São José de Rio Preto, SP, 1991-1994. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 1996; 29(6):543-8.
- 18-Chieffi PP. Algumas questões decorrentes da reintrodução do *Aedes aegypti* no Brasil. **Cad. Saúde Públ.** 1985; 1(3): 385-7.
- 19-Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.
- 20-Defoliart GR, Grimstad PR, Watts DM. Advances in mosquito-borne arbovirus-vector research. **Annu. Rev. Entomol.** 1987; 32: 479-505.
- 21-Donalisio MR. **O dengue no espaço habitado.** São Paulo: Hucitec; 1999.
- 22-Estrada-Franco JG, Craig GB. **Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*.** Washington (DC): Pan American Health Organization; 1995 (Technical paper No. 42).
- 23-Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.** 2000; 2(13): 1643-9.

- 24-Forattini OP. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Rev. Saúde Pública** 1986; 20 (3): 244-5.
- 25-Forattini OP, Kakitani I, dos Santos R, Kobayashi KM, Ueno HM, Fernández Z. Comportamento de *Aedes albopictus* e de *Ae. scapularis* adultos (Díptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública** 2000; 34(5): 461-7.
- 26-Galindo P, Grayson MA. *Culex (Melanoconion) aikenii*: Natural vector in Panama of Endemic Venezuelan encephalitis. **Science** 1971; 172: 594-5.
- 27- Gargan TP, Bailey CL, Higbee GA, Gad A, Said SE. The effect of laboratory colonization on the vector-pathogen interactions of Egyptian *Culex pipiens* and Rift valley virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1983; 32(5): 1154-63.
- 28-Grimstad PR, Craig GB Jr., Ross QE, Yuill TM. *Aedes triseriatus* and La Crosse virus: Geographic variation in vector susceptibility and ability to transmit. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1977; 26: 990-6.
- 29-Gubler DJ, Rosen L. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue viruses. **Am. J. Trop. Med Hyg** 1976; 25:318-25.
- 30-Gubler DJ, Nalim S, Tan R, Saipan H, Saroso JS. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1979; 28: 1045-52.
- 31-Gubler DJ. Dengue. In Monath TP (ed). **The arboviruses:**

- epidemiology and ecology**. Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Fla; 1988. p. 223-60.
- 32-Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Am. Rev. Entomol.** 1983; 28: 229-62.
- 33-Hardy JL. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In: Monath TP (ed). **The arboviruses: epidemiology and ecology**. Vol. I CRC Press, Boca Raton, Fla; 1988. p. 87-126.
- 34-Hawley W A, Reiter P, Pumpuni CB, Copeland R, Craig Jr GB. *Aedes albopictus* in North America: Probable introduction in tires from Northern Asia for North Asian origin. **Science**. 1987; 236: 1114 – 6.
- 35-Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. **J Am Mosq Control Assoc** 1988; Suppl 1: 1-40.
- 36-Harris E, Videz E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez MA et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med Hyg.** 2000; 63 (1,2): 5-11.
- 37-Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantification In: Brian WJ, Kangro HO (eds). **Virology Methods Manual**. Academic Press; 1996 p. 25-46.
- 38-Ibañez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C et al. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Med Vet. Entomol.** 1997; 11: 305-9.

- 39- Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J. Gen. Virol.** 1978; 40: 531-44.
- 40-Kambhampati S, Black WC IV, Rai KS, Sprenger D. Temporal variation in genetic structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* in the United States. **Heredity.** 1990; 74: 371-4.
- 41- Kramer LD, Hardy JL, Presser SB, Houk EJ. Dissemination barriers for western equine encephalomyelitis virus in *Culex tarsalis* infected after ingestion of low viral doses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1981; 30: 190-7.
- 42-Krebs CJ. **Ecological Methodology.** Addison Wesley Longman, Inc; 1999
- 43-Kubes V, Rios FA. The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. **Science.** 1939; 90: 20.
- 44-Lorenz L, Beaty BJ, Aitken THG, Wallis GP, Tabachnick WJ. The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1984; 33(4): 690-4.
- 45- Lourenço De Oliveira R, Vaizelle M, Bispo de Filippis AM, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2003.
- 46-Lowenberg-Neto P, Navarro-Silva MA. First report of *Aedes albopictus*

- in the state of Santa Catarina, Brazil. **Rev. Saúde Pública** 2002; 36(2): 246-7.
- 47- Marques GRAM, Gomes A de C. Comportamento antropofílico de *Aedes albopictus* (Skuse) (Díptera: Culicidae) na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**. 1997; 31: 125-30.
- 48-Merrill MH, Tenbroeck C. The transmission of equine encephalomyelitis virus by *Aedes aegypti*. **J. Exp. Med.** 1935; 62: 687-95.
- 49-Miller BR, Ballinger ME. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1988; 82: 476-7.
- 50-Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Distribuição dos sorotipos de dengue no Brasil. Brasil, 2002.
- 51-Mitchell CJ. Mosquito vector competence and arboviruses In: Harris KF (ed). **Current topics in vector research**. Praeger Scientific, New York; 1983. p. 63-92.
- 52-Mitchell C. Vector competence of North and South American strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: A review. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1991; 7(3): 446-51.
- 53-Moncayo AC, Edman JD, Turell MJ. Effect of Eastern equine encephalomyelitis virus on the survival of *Aedes albopictus*, *Anopheles quadrimaculatus*, and *Coquillettidia perturbans* (Diptera:Culicidae). **J. Med. Entomol.** 2000; 37(5): 701-6.

- 54-Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG.
Isolation of dengue virus type 2. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 1990;
85(2): 253.
- 55-Nogueira RMR, Zagner SMO, Martins ISM, Lampe E, Miagostovich
MP, Schatzmayr HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock
syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Mem. Inst.
Oswaldo Cruz** 1991; 86 (2): 269.
- 56-Ogata K, Samayoa AL. Discovery of *Aedes albopictus* in Guatemala.
J. Am. Mosq. Control Assoc. 1996; 12(3): 503-6.
- 57-Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos
AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary
report. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 1983; 25(1): 53-4.
- 58-Rai K S. *Aedes albopictus* in the Americas. **Ann Rev Entomol** 1991,
36: 459-84.
- 59-Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C
et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased
pathogenicity in the Américas. **Virology** 1997; 230: 244-51.
- 60-Rocco IM, Kavakama BB, Santos CLS. First isolation of dengue 3 in
Brazil from an imported case. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. 2001;
43(1): 55-7.
- 61-Rodhain F. Problemes poses par l'expansion d'*Aedes albopictus*.
Bull. Soc. Path. Exot. 1996; 89:137-41.
- 62-Rodríguez-Tovar ML, Ortega-Martínez MG. *Aedes albopictus* in

- Muzquiz city, Coahuila, México. **J. Am. Mosq. Control Assoc** 1994; 10(4): 587.
- 63-Romano-Lieber N, Iversson LB. Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Rev. Saúde Pública** 2000; 34(3): 236- 42.
- 64- Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1987; 3: 398-402.
- 65- Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1983; 32: 1108-19.
- 66-Rossi GC, Pascual NT, Krsticevic FL. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. **J. Am. Mosq. Control Assoc** 1999; 15(3): 422.
- 67-Sachs L. **Applied Statistics. A Handbook of Techniques**, 2nd ed. Springer-Verlag New York Inc; 1984.
- 68-Sant'Ana AL. Primeiro encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Estado do Paraná, Brasil. **Rev. Saúde Pública** 1996; 30: 392-3.
- 69-Santos R La C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Rev. Saúde Pública** 2003 (aceito)
- 70-Santos SO, Nascimento JC. Primeiro registro da presença do *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em Mato Grosso do Sul. Brasil. **Rev. Saúde Pública** 1998; 32(5):486. (ERRATA: **Rev. Saúde Pública**

- 1999; 33(1):109).
- 71-Sellers RF, Bergold GH, Suarez OM, Morales A. Investigations during Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuela 1962-1964. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1965; 14: 460-9.
- 72-Site Oficial de Pindamonhangaba. 2003. **Geografia.** <http://www.pindamonhangaba.com.br>.
- 73-Sudia WD, Newhouse VF, Henderson BE. Experimental infection of horses with three strains of Venezuelan equine encephalomyelitis II. Experimental vector studies. **Am. J. Epidem.** 1971; 93: 206-11
- 74-Tesh R. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 1979; 28(6): 1053-9.
- 75- Travassos Da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Rodrigues SG, Travassos Da Rosa JFS. **Manual de procedimentos técnicos para coleta de amostra e diagnóstico laboratorial das encefalomyelites eqüinas.** Belém: Laboratório de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas; 1992 (FUNASA – Documento Técnico nº 2).
- 76-Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux A. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. **Am. J. Trop. Med and Hyg.** 1999; 60(2): 292-9.
- 77-Vazeille M, Rosen L, Mousson L, Failloux AB. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia

- compared with that of *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2003; 68(2): 203-8.
- 78-Vélez ID, Quiñones ML, Suárez MO, Olino L, Múrcia LM, Correa E et al. Presença de *Aedes albopictus* em Letícia Amazonas, Colômbia. **Biomédica** 1998; 18(3): 192.
- 79-Walton TE, Grayson MA. Venezuelan equine encephalomyelitis,. In: Monath TP (ed.). **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Vol. IV. CRC Press, Boca Raton, Fla; 1988. p. 203-33.
- 80-Wang E, Ni H, Xu R, Barret ADT, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J.Virol.** 2000; 74(7): 3227-34.
- 81-Weaver SC, Scott TW, Lorenz LH, Lerdthusnee K, Romoser WS. Togavirus-associated pathologic changes in the midgut of a natural mosquito vector. **J. Virol.** 1988; 62(6): 2083-90.
- 82-Weaver SC, Rico-Hesse R, Scott TW. Genetic diversity and slow rates of evolution in New World alphaviruses. **Curr. Topics Microbiol. Immunol.** 1992; 176: 99-117.
- 83-Weaver S C, Lorenz L H, and Scott T W. Distribution of western equine encephalitis virus in the alimentary tract of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) following natural vs. artificial blood meals. **J. Med. Entomol.** 1993; 30(2): 391-7.
- 84-Weaver SC, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig GV, Oberste MS, Boshell J, Tesh RB. Re-emergence for epidemic Venezuelan equine