UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARIELA PIRES CABRAL PICCIN

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DA DENSIDADE DE VETORES E DA PRESENÇA DE *A. aegypti* INFECTADOS COM A OCORRÊNCIA DE DENGUE NA CIDADE DE VITÓRIA

VITÓRIA
2013

MARIELA PIRES CABRAL PICCIN

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DA DENSIDADE DE VETORES E DA PRESENÇA DE *A. aegypti* INFECTADOS COM A OCORRÊNCIA DE DENGUE NA CIDADE DE VITÓRIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profª. Dra. Elenice Moreira Lemos.

Co – orientador: Prof. Dr.Adelmo Inácio Bertolde.

VITÓRIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Piccin, Mariela Pires Cabral, 1987-

P588a Avaliação da relação da densidade de vetores e da presença de Aedes aegypti infectados com a ocorrência de dengue na cidade de Vitória / Mariela Pires Cabral Piccin. – 2013.

81 f. : il.

Orientadora: Elenice Moreira Lemos.

Coorientador: Adelmo Inácio Bertolde.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Dengue. 2. Aedes aegypti. 3. Epidemiologia. 4. Geoprocessamento. 5. Vitória (ES). I. Lemos, Elenice Moreira. II. Bertolde, Adelmo Inácio. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda MARIELA PIRES CABRAL PICCIN apresentou a dissertação intitulada **"Avaliação da relação da densidade de vetores e da presença de *A. aegypti* infectados com a ocorrência de dengue na cidade de Vitória"** em sessão pública, no dia 26 de abril de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica MARIELA PIRES CABRAL PICCIN a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 26 de abril de 2013

Prof. Dr. Ricardo Tristão Sá
(Membro Externo)

Profa. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel
(Membro Interno)

Profa. Dra. Elenice Moreira Lemos
(Orientadora)

Profa. Dr. Adelmo Inácio Bertolde
(Coorientador)

Aos meus pais,

“porque a vida só se dá a quem se deu”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, à Nossa Senhora Desatadora de Nós e a Santo Antônio, por tudo;

Aos meus pais, Alexandra e Julio, por toda a dedicação, o amor, o carinho, o investimento na minha educação e por terem me ensinado o valor da cultura e do conhecimento;

À minha família: meus avós Aecio e Victoria e meus irmãos, Maíra e Daniel, e também à Flávia, por ser família no sentido mais puro e verdadeiro da palavra;

À minha orientadora, Doutora Elenice Moreira Lemos, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela orientação;

À Professora - doutora Angelica Espinosa Barbosa Miranda, pelas orientações na parte epidemiológica do estudo;

Ao Professor - doutor Adelmo Bertolde, pela enorme ajuda e execução das análises estatísticas dos dados;

À Juliana Carnielli, pela execução das análises dos mosquitos, com muito capricho e dedicação, mas, principalmente, pela constante ajuda, boa vontade e pela amizade;

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas na PMV: Kely Rose Areal, Maria Izabel Trommer, Ana Paula Bonomo e Marco André Tonini pelo fornecimento de amostras e hemogramas;

Às funcionárias do Serviço de Vigilância Epidemiológica da PMV Bianca Cesana e Patricia Borges, pelo fornecimento de dados;

Ao Joaquim Ferreira, bioquímico do LACEN-ES, pelo fornecimento das amostras;

À Teresa Gomes, por me ensinar as técnicas de geoprocessamento, e também por ser a irmã que eu encontrei neste mestrado;

À Barbara Reis dos Santos, pela ajuda na análise dos dados e pela enorme boa vontade;

A todos que passaram pela Dengue e contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho: Camila Giuberti, Nayana de Oliveira Souza, Gregório Cavalcante, Lygia Herkenhoff, e Jauber Pissinatti;

Ao Lableish, pelo acolhimento;

À Solange Alves Vinhas e Carla Baroni, por sempre estarem dispostas a responder às minhas dúvidas de PCR;

Aos funcionários e professores da Pós – Graduação e do Núcleo de Doenças Infecciosas;

À Turma PGDI11, principalmente ao meu Quarteto Fantástico! Nunca achei que uma turma de mestrado poderia ser tão divertida... Obrigada, obrigada, obrigada! E não se esqueçam: “É uma cilada, Bino!”.

À minha grande amiga Helena Lima Gomes, por me acompanhar de perto desde que eu era apenas “uma mera IC”;

À farmacêutica Silvia Correia, por todos os ensinamentos e oportunidades desde o estágio no LACEN;

Aos amigos da FarmaUfes: Mariana Dadalto, Maria José Chiabai, Flávia Oliveira e Allen de Paula Nunes. Obrigada por tudo que aprendemos juntas!

À Diana Goetze, por toda a torcida, apoio, incentivo e amor durante toda a nossa convivência;

À minha terapeuta Fabiana Ramos, por ser parte essencial no meu amadurecimento como ser humano;

Aos grandes amigos que fiz pela vida: Carolina Pierazzo, Maria Guimarães, Joaquim Ferreira Silva Neto, Lucas Gazolli, Isabella Maioli, Rafael Ambrósio, Natália Gimenes, Leonardo Grão Velloso, Fernanda de Vargas, Roger Zampier e tantos outros...Obrigada por serem parte essencial de mim! “Oh, I get by with a little help from my friends...”

“Pois se foi permitido ao homem
Tantas coisas conhecer
É melhor que todos saibam
O que pode acontecer...”

(“Queremos saber”, Gilberto Gil, 1976)

RESUMO

A dengue é uma doença febril aguda causada pelo DENV, o qual agrupa quatro sorotipos distintos. Sua transmissão se dá pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor de importância epidemiológica. O controle do vetor e a vigilância epidemiológica são as principais ferramentas para a contenção de novas epidemias. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação entre densidade de vetores e presença de *A. aegypti* infectados com a ocorrência de dengue em Vitória, durante a epidemia de 2011. Para isso, foram analisados casos confirmados laboratorialmente e notificados no SINAN, bem como os dados fornecidos pelo programa MI – DENGUE. Para a identificação dos sorotipos circulantes, foram realizados ensaios de RT – PCR. Foi também realizado o geoprocessamento, por bairro, dos casos humanos, da densidade de vetores e das armadilhas contendo *A. aegypti* infectados. Os resultados mostraram uma ligeira predominância do sexo feminino na amostra analisada e que 64,18% dos casos ocorreram em pessoas acima de 18 anos. A maioria dos casos de dengue observados foi classificada como dengue clássica, enquanto cerca 10% foram classificados como as formas mais graves de dengue, como “dengue com complicações” ou “febre hemorrágica da dengue”. Em 8,23% dos casos houve a ocorrência de internação e dois óbitos foram contabilizados durante o período. Por meio da análise temporal, foi visto que o aumento da densidade de vetores ocorreu nas épocas mais quentes e chuvosas, e precedia o aumento do número de casos humanos. Não foi encontrada correlação entre a densidade de vetores e a incidência de dengue nos bairros ($p=0.848$) porém foi visto que os bairros onde foram encontrados mosquitos infectados possuíam maior incidência de dengue que os bairros sem mosquitos infectados ($p=0.009$). O principal sorotipo circulante em Vitória, em 2011, foi o DENV-1 seguido pelo o DENV-2. Portanto, este estudo demonstra que, tão importante quanto monitorar a densidade de vetores, é investigar a presença de vetores infectados nas cidades com o objetivo de predizer possíveis epidemias de dengue.

Palavras chave: Dengue. *Aedes aegypti*. Sorotipos. Características epidemiológicas. Geoprocessamento. Vitória.

ABSTRACT

Dengue is an acute febrile disease caused by dengue virus (DENV), which groups four serotypes. It is transmitted by the bite of female mosquitoes of the gender *Aedes*, being the *Aedes aegypti* the principal vector with epidemiologic importance. Vector control and epimiological surveillance are the principal tools for epidemic's contention. So, the objective of this study was to observe the relationship between vector density or infection of the vectors by DENV with the cases of dengue in Vitória. Confirmed and notified cases on SINAN and data from the programme MI –Dengue were analised. For the identification of virus serotypes, it was made RT-PCR. Also, it was described the spatial distribution of human cases of dengue, as well the spatial distribution of vector's density and the traps where infected mosquitoes were found. As a result, it was found a small predominance of women in the sample analised (54,27%) and 64,18% of the cases occurred in people with more than 18 years old. 90,74% were classified as dengue fever, while 6,60% were classified as "dengue with complications" and 2,66% as "dengue haemorrhagic fever". In 8,23% of the cases, there was the necessity of hospitalization and 2 deaths were contabilized during the period. Trough the temporal analysis, it was observed that the increase in vector's density occurred in the warm and rainy times, and it preceeded the increase in human cases. During all the year of 2011, *A. aegypti*'s density in the city was considered as "moderate" or "critical". It was not observed a correlation between vector's density and incidence of dengue in the neighborhoods ($p = 0.848$), but the neighborhoods where it was found infected mosquitoes had greater incidence of dengue than the neighborhoods without infected vectors (0.009). By the RT-PCR assay, it was observed that the major serotype found in human samples and in vector samples was DENV-1 (96,56% e 82,35%, respectively). DENV-2 was also found in circulation, but in smaller rates.

Key words: Dengue. *Aedes aegypti*. Serotypes. Epidemiological features. Spatial Distribution. Vitória.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curso da infecção pelo vírus DENV e suas diferentes fases. Adaptado de WHO, 2009.....20

Figura 2: Distribuição da dengue no mundo. Em verde, países que já reportaram casos ou estão em risco para epidemias de dengue. Em vermelho, delimitação da área de distribuição do vetor Aedes aegypti. Extraído de WHO, 2012.....23

Figura 3: Divisão das gerências regionais de Vitória, Espírito Santo. Extraído de PMV, 2012. 35

Figura 4: Número de casos de dengue e Índice Médio de Fêmeas de *A. aegypti* (IMFA), por mês, detectados durante o ano de 2011 em Vitória.....49

Figura 5: Correlação cruzada entre o IMFA semanal e o número de casos de dengue por semana. 50

Figura 6: Variáveis climáticas e densidade de vetores em Vitória, 2011.....51

Figura 7: Incidência anual de dengue por 100.000 habitantes em cada bairro de Vitória, em 2011. 52

Figura 8: IMFA semanais médios distribuídos por bairro, em Vitória, 2011. 53

Figura 9: Gráfico de dispersão entre incidência anual de dengue nos bairros e IMFA. 54

Figura 10: Distribuição das armadilhas contendo *A. aegypti* infectados pelo DENV em Vitória. Em amarelo, bairros nos quais foi detectada a presença de mosquitos infectados. Em bege, bairros nos quais a presença de mosquitos infectados não foi observada.....54

Figura 11: Média de incidência de dengue em bairros com e sem a presença de *A. aegypti* infectados. Em (A), bairros aonde foi observada a presença de mosquitos infectados. Em (B), bairros nos quais não foi detectada a presença de vetores

infectados. O bairro Jardim Camburi foi excluído da análise por ser um dado extremo. 55

Figura 12: Gel de agarose da etapa de Semi – Nested PCR. Coluna 1: Controle negativo; Coluna 2: Controle positivo DENV-1; Coluna 3: Controle positivo DENV – 2; Coluna 4: Controle positivo DENV – 3; Coluna 5: Branco; Colunas 6 a 11: Amostras de pacientes; Coluna 12: Padrão de peso molecular; Colunas 13 a 16: Amostras de pacientes. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência dos iniciadores utilizados e tamanho, em pares de bases (bp), dos produtos amplificados.....42

Tabela 2: Características sociodemográficas dos pacientes portadores de dengue residentes em Vitória, ES, no ano de 2011. 47

Tabela 3: Aspectos clínicos da dengue ocorrida em Vitória em 2011. 48

Tabela 4: Sorotipos de DENV encontrados em amostras humanas. 56

Tabela 5: Sorotipos de DENV encontrados em lotes de *A. aegypti*. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE: *Antibody Dependent Enhacement* – Facilitação dependente de anticorpo

AVE: Tampão de eluição de RNA

C: Proteína do Core

D1: iniciadorsenso para o vírus da dengue

D2: iniciador anti - senso para o vírus da dengue

d.C.: Depois de Cristo

DC: Dengue Clássica

DENV:Vírus da dengue

DENV – 1: Vírus da dengue sorotipo 1

DENV – 2: Vírus da dengue sorotipo 2

DENV – 3: Vírus da dengue sorotipo 3

DENV – 4: Vírus da dengue sorotipo 4

DTT: Ditiotreitol

E: Proteína do envelope

ELISA: *Enzyme – linked immunosorbent assay* – Ensaio imunoenzimático

FHD: Febre Hemorrágica da Dengue

IgM: Imunoglobulina do tipo M

IB: Índice de Breteau

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

IIP: Índice de Infestação Predial

IMFA: Índice Médio de Fêmeas de *A. aegypti*

LIRAa: Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *Aedes aegypti*

MAC - ELISA: *IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay* – Ensaio imunoenzimático para captura de IgM

$Mg(CH_3COO)_2$: Acetato de magnésio

$MgCl_2$: Cloreto de magnésio

MI – DENGUE: Monitoramento Inteligente da Dengue

NDI: Núcleo de Doenças Infecciosas

NS1: *Non structural protein* 1 – Proteína não – estrutural 1

NS2: *Non structural protein* 2 – Proteína não – estrutural 2

NS3: *Non structural protein* 3 – Proteína não – estrutural 3

NS4: *Non structural protein* 4 – Proteína não – estrutural 4

NS5: *Non structural protein* 5 – Proteína não – estrutural 5

PMV: Prefeitura Municipal de Vitória

PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue

prM: Proteína de membrana

RT – PCR: *Reverse transcriptase – polymerase chain reaction*– Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase

SAD 69: *South American Datum* 1969 – Sistema geodésico regional para a América do Sul

SCD: Síndrome do Choque da Dengue

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TS1: iniciador específico para o sorotipo 1

TS2: iniciador específico para o sorotipo 2

TS3: iniciador específico para o sorotipo 3

TS4: iniciador específico para o sorotipo 4

UTM: Universal Transverse Mercator

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

2. OBJETIVOS 32

2.1. OBJETIVO GERAL 32

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

3. METODOLOGIA 34

3.1 ASPECTOS ÉTICOS 34

3.2 DESENHO DO ESTUDO 34

3.3 LOCAL DE ESTUDO 34

3.4 PERÍODO DE ESTUDO 35

3.5 POPULAÇÃO DE ESTUDO 36

3.5.1 POPULAÇÃO HUMANA 36

3.5.2 POPULAÇÃO DE MOSQUITOS 36

3.6 ANÁLISE DOS DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES 37

3.7 ANÁLISE TEMPORAL DOS CASOS DE DENGUE E DENSIDADE DE *A. aegypti* 37

3.8 GEOPROCESSAMENTO DOS CASOS HUMANOS, DA DENSIDADE DE VETORES E DA LOCALIZAÇÃO DAS ARMADILHAS CONTENDO *A. aegypti* INFECTADOS 38

3.9 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS VIRAIS CIRCULANTES 40

3.9.1 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS EM AMOSTRAS HUMANAS 40

3.9.1.1 PESQUISA DA PROTEÍNA NS1 EM SORO.....40

3.9.1.2 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....41

3.9.1.3 SÍNTESE DO cDNA 41

3.9.1.4 Amplificação do cDNA por reação em cadeia da Polimerase (PCR) 41

3.9.1.5 Semi – Nested PCR.....42

3.9.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS VIRAIS EM AMOSTRAS DE MOSQUITOS 43

3.9.2.1 Extração de RNA a partir de amostras de mosquitos 43

3.9.2.2 Transcrição reversa do RNA em cDNA.....44

4. RESULTADOS..... 46

4.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES 46

4.2 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE DE VETORES E CASOS DE DENGUE 48

4.2.1 CORRELAÇÃO TEMPORAL.....48

4.2.2 CORRELAÇÃO ESPACIAL.....51

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE *A. aegypti* INFECTADOS POR DENV E INCIDÊNCIA DA DOENÇA.....54

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS CIRCULANTES 55

4.3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS EM AMOSTRAS HUMANAS 55

4.3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS EM AMOSTRAS DE *A. aegypti* 57

5. DISCUSSÃO 59

6. CONCLUSÕES 67

7. REFERÊNCIAS 69

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda causada pelo vírus Dengue (DENV), tendo sido descritos quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O DENV pertence à família *Flaviviridae*, e está agrupado no gênero *Flavivirus*, juntamente com outros vírus patogênicos, tais como o vírus do Oeste do Nilo, o vírus da Encefalite Japonesa e o vírus da Febre Amarela (Kuhn *et al.*, 2002). Devido ao fato de sua transmissão se dar pela picada de artrópodes vetores, o DENV é considerado um arbovirus ("arthropod borne virus").

O genoma do DENV consiste em um RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11kb. A partícula viral madura consiste de três proteínas estruturais (C, prM e E), as quais integram o core, a membrana e o envelope, respectivamente, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2 A e B, NS3, NS4 A e B, NS5) envolvidas na replicação viral (Perera & Kuhn 2009). A infecção por um sorotipo confere ao indivíduo imunidade duradoura contra uma infecção subsequente contra o mesmo sorotipo, porém somente temporária contra os demais, sendo possível, assim, a ocorrência de infecções secundárias (Rothman, 2003).

A dengue é uma doença de amplo espectro clínico, o qual abrange desde uma infecção assintomática ou oligossintomática, bem como uma infecção sintomática conhecida como febre da dengue (FD) ou dengue clássica até formas mais graves, a febre hemorrágica da dengue (FHD), podendo evoluir para a síndrome do choque da dengue (SCD) (WHO,2009). Estudos populacionais sugerem que infecções assintomáticas são o principal desfecho da exposição ao DENV (Teixeira *et al.*, 2002; Siqueira Jr. *et al.*, 2005). Após o período de incubação, a doença se inicia abruptamente e cursa em três diferentes fases: febril, crítica e de restabelecimento (WHO,2009).

A fase febril se caracteriza por um início súbito de febre, com duração normalmente de dois a sete dias, em combinação com sinais e sintomas tais como cefaleia intensa, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, desconforto gastrintestinal e, comumente, *rash* cutâneo. Pequenas manifestações hemorrágicas podem ocorrer na forma de petéquias, epistaxe ou sangramento gengival. A fase crítica ocorre durante o período

de defervescência, que acontece de três a sete dias após o início da doença, e cursa com aumento da permeabilidade vascular e dos níveis de hematócrito. Durante esta fase, nota-se progressiva leucopenia e uma diminuição rápida na contagem de plaquetas, a qual precede um possível extravasamento plasmático. Assim, caso não haja um significativo aumento na permeabilidade vascular, o paciente se restabelece. Caso contrário, sinais clínicos como ascite e efusão pleural podem aparecer. A magnitude e a gravidade do quadro clínico dependem do grau de extravasamento plasmático, bem como do manejo clínico adotado e ocorrência de reposição de fluidos. O choque ocorre quando um volume significativo de plasma é perdido, e há manifestações tais como hipotermia, hipotensão e, se prolongado, coagulação intravascular disseminada, acidose metabólica e hipoperfusão orgânica. Sinais como hepatite, miocardite, encefalite e sangramentos graves podem estar presentes, podendo o quadro evoluir para óbito. A fase de restabelecimento inicia-se 48 a 72 horas após a fase crítica, e é o período no qual há a reabsorção gradual do extravasamento plasmático. Nesta fase, ocorre melhora do bem–estar geral do paciente, e sinais como *rash*, prurido generalizado e bradicardia podem estar presentes (WHO, 2009). As características clínicas e laboratoriais de cada fase estão representadas na Figura 1, a seguir:

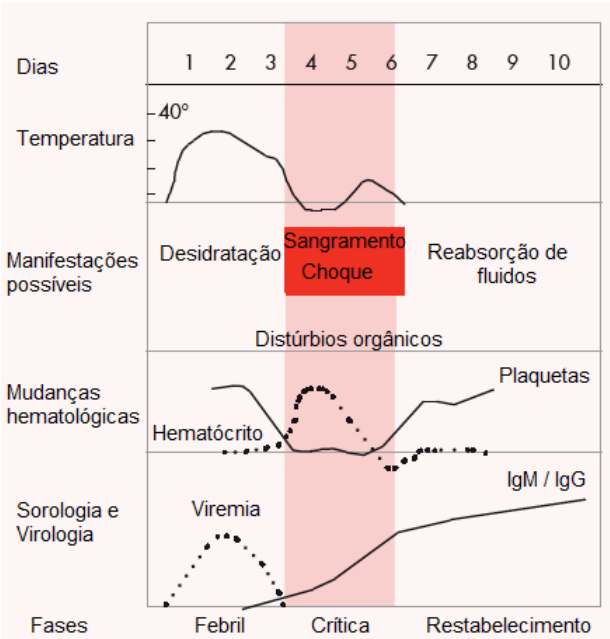

Figura 1: Curso da infecção pelo vírus DENV e suas diferentes fases. Adaptado de WHO, 2009.

A patogênese dos casos graves de dengue parece ser multifatorial, envolvendo interações entre as características virais, status imune do indivíduo e seu repertório genético. São vários os fatores que podem influenciar na gravidade da infecção pelo DENV. Dentre eles, pode-se destacar a diferença na virulência entre os diferentes sorotipos (Ocazionez *et al.*, 2007), a idade dos pacientes (Guzman *et al*., 2002), a raça (Sierra *et al.*, 2007) e a sequência de infecções por diferentes sorotipos, o que pode levar ao fenômeno conhecido como Facilitação Dependente de Anticorpo ("*Antibody Dependent Enhacement* – ADE"). De acordo com esta teoria, uma infecção subsequente em indivíduos já sensibilizados por um diferente sorotipo pode levar a um quadro clínico mais grave, devido ao fato de anticorpos neutralizantes para o sorotipo homólogo, e não neutralizantes para os demais sorotipos, facilitar a entrada dos vírus nas células, resultando em um maior número de células infectadas e, consequentemente, na exacerbação da resposta imunológica (Halstead & O'Rourke, 1977).

Em relação à diferença de virulência entre os sorotipos, vários estudos já foram feitos a fim de se confirmar esta hipótese, tendo sido encontrados resultados contraditórios. Alguns trabalhos demonstraram que há manifestações clínicas mais associadas com um determinado sorotipo do que com outro, porém não encontraram relação entre um desfecho clínico mais grave e um determinado sorotipo (Chan *et al.,* 2009; Thomas *et al.*, 2008). Esta relação, entretanto, já foi demonstrada em outros estudos. Em alguns deles, o sorotipo 2 mostrou-se mais relacionado com quadros hemorrágicos que outros sorotipos (Fried *et al.,* 2010; Vaughn *et al.*, 2000; Ocazionez *et al.*, 2007). Um outro estudo, entretanto, ao comparar os sorotipos 1 e 2, observou que epidemias causadas majoritariamente pelo DENV-1 eram mais graves que as causadas pelo DENV-2 (Balmaseda *et al.,* 2006). Apesar das diferenças de gravidade encontradas entre os sorotipos, como muitas vezes há mais de uma variável influenciando no prognóstico do quadro clínico, como por exemplo, a ocorrência de infecção prévia, torna-se difícil afirmar que o sorotipo seja o determinante das formas mais graves da doença.

Estima-se que ocorra, anualmente, a hospitalização de aproximadamente 500.000 indivíduos com as formas mais graves de dengue, FHD ou SCD, em todo o mundo, e que a mortalidade entre esses casos mais graves gire em torno de 2.5% (WHO, 2012).

Devido à possibilidade de evolução da infecção pelo DENV para formas mais graves, o diagnóstico precoce pode ajudar na triagem dos pacientes e no manejo clínico, para a prevenção das possíveis complicações. Como a dengue cursa com um quadro clínico semelhante ao de outras doenças febris, tais como a leptospirose, somente o diagnóstico clínico é insuficiente, sendo necessária a confirmação laboratorial dos casos (Sergio *et al.,* 2012).

Um dos métodos de diagnóstico mais freqüentemente utilizados na rotina é a detecção de anticorpos IgM por meio da técnica de ELISA de captura, MAC-ELISA. Porém, este teste tem como desvantagem a baixa sensibilidade nos primeiros dias de doença, sendo utilizado, assim, na fase de convalescência. Outros métodos de diagnóstico disponíveis, os quais podem ser utilizados na fase aguda, são os que se baseiam na pesquisa do vírus ou antígenos virais, tais como a pesquisa da proteína NS1 por métodos imunocromatográficos ou ELISA, a pesquisa do vírus por meio de isolamento viral em cultura de células ou a pesquisa do material genético viral por meio de técnicas de biologia molecular, como a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Guzmán & Kourí, 2004).

Uma grande vantagem dos métodos que se baseiam na detecção do vírus ou de seu material genético, tais como o isolamento viral e a RT-PCR, é a possibilidade do conhecimento do sorotipo do vírus. Porém, como o isolamento viral leva vários dias ou semanas para se tornar positivo e nem sempre é bem sucedido, pois pode ser influenciado por fatores como baixas cargas virais no inóculo, complexos vírus – anticorpos e manipulação inadequada da amostra, o desenvolvimento da RT-PCR na detecção do DENV permitiu com que os sorotipos fossem identificados de maneira mais rápida e sensível (Lanciotti *et al.*, 1992). A utilização da RT-PCR na detecção precoce dos casos suspeitos e no monitoramento da circulação viral tem se demonstrado uma importante ferramenta diagnóstica, com a vantagem de não apresentar variação na sensibilidade entre casos primários e secundários, além de não sofrer interferência da presença ou não de anticorpos IgM nos soros a serem testados (Cordeiro *et al*., 2007).

Estima-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas, ou seja, mais que 40% da população mundial, estejam em risco de adquirir dengue. A Organização Mundial de Saúde

estima que o número de casos anuais da doença deva ser de 50 a 100 milhões em todo o mundo. Antes de 1970, apenas nove países haviam registrado epidemias graves de dengue. Porém, atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países da África, Américas, oeste do Mediterrâneo, sudeste asiático e Pacífico ocidental, sendo estas duas últimas as regiões mais seriamente afetadas (WHO, 2012).

Figura 2: Distribuição da dengue no mundo. Em verde, países que já reportaram casos ou estão em risco para epidemias de dengue. Em vermelho, delimitação da área de distribuição do vetor Aedes aegypti. Extraído de WHO, 2012.

As primeiras grandes epidemias de dengue bem documentadas datam de 1779 (Jacarta, na Indonésia e Cairo, no Egito) e 1780 (Filadélfia, EUA). Porém, episódios clínicos sugestivos de dengue já haviam sido registrados na China, entre os anos 265 e 420 d.C. Nestes registros, a dengue era referida como “veneno d´água”, evidentemente associando a doença com insetos que se reproduziam em ambientes aquáticos (Leung, 1993). Apesar de o vírus ser conhecido desde a Antiguidade, seu isolamento só ocorreu na década de 1940, por Kimura e Hotta (Kimura & Hotta, 1944). Logo após o seu isolamento, Sabin observou que cepas que circulavam no Havaí e na Nova Guiné possuíam características antigênicas diferentes, o que o levou a pensar que haveria diferentes sorotipos para um mesmo vírus. Assim, denominou-se sorotipo DENV-1 às cepas isoladas no Havaí e, sorotipo DENV-2, às cepas isoladas na Nova Guiné (Sabin, 1952). Os sorotipos DENV-3 e DEN-4 foram identificados na década de 1950, durante uma epidemia ocorrida no sudeste asiático (Hammon *et al.,* 1960).

A disseminação mundial dos quatro sorotipos do vírus Dengue provavelmente se deu após a Segunda Guerra Mundial, devido a fatores tais como urbanização descontrolada, facilitação de movimentos migratórios por viagens aéreas e gestão inadequada dos serviços sanitários, bem como programas ineficientes de controle do vetor. Esta disseminação contribuiu para que diferentes sorotipos do vírus, que anteriormente circulavam isolados em diferentes territórios, passassem a ser encontrados cocirculando em uma mesma região geográfica. Foi justamente no período pós-guerra que houve as primeiras epidemias com grande número de casos graves da doença, que até então era considerada benigna (Gubler, 1998).

No Brasil, há evidências de casos de dengue desde o Segundo Reinado, entre os anos de 1846 e 1853 (Barreto & Texeira, 2008). Porém, os primeiros trabalhos científicos mostrando a ocorrência de dengue em território nacional são do início do século XX. Um destes trabalhos descreve o quadro clínico de doze pacientes de Niterói, Rio de Janeiro, diagnosticados clinicamente como portadores de dengue (Pedro, 1923).

A primeira epidemia de dengue bem documentada no Brasil é de 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista, Roraima. Essa epidemia foi rapidamente debelada (Osanai *et al*., 1983). Em 1986, o DENV-1 foi reintroduzido em território nacional, tendo sido detectado no Rio de Janeiro e, desde esta reintrodução, o Brasil se tornou o país com o maior número de notificações da doença para a Organização Mundial de Saúde, contabilizando, de 2001 a 2007, aproximadamente 98,5% dos casos reportados pelo cone sul americano (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai). Além disso, o Brasil é também o país com as mais altas taxas de casos fatais desta subregião (WHO, 2009).

Após a entrada do DENV-1, os outros sorotipos também foram encontrados em circulação no Brasil: o DENV-2 começou a circular em 1990 (Nogueira *et al.*, 1990) e o DENV-3, em 2000 (Nogueira *et al*., 2001). Mais recentemente, em 2010, o DENV-4 foi detectado em Roraima (Temporão *et al.*, 2011) e, desde então, este sorotipo já foi detectado em outros estados, como no Amazonas, Pará, Piauí, Pernambuco, Bahia, Ceará, Rio de Janeiro e São Paulo (Nogueira & Eppinghaus, 2011) e, mais recentemente, no Espírito Santo (Comunicação pessoal).

As primeiras notificações de dengue no Espírito Santo ocorreram em 1995 e, até 2011, 291.292 casos foram notificados, sendo 52 fatais. No ano de 2011, o Espírito Santo foi o estado com maior incidência de casos notificados de dengue na Região Sudeste (MSa , 2012). Em Vitória, capital do estado, a presença do *Aedes aegypti* foi primeiramente detectada em 1992 (Funasa, 1999) e, desde o aparecimento dos primeiros casos humanos da doença, em 1995, ocorreram no município várias epidemias, provavelmente causadas pela introdução seqüencial dos sorotipos DENV-2 (1995), DENV-1 (1996), DENV-3 (2003) (MSa, 2012; Cardoso *et al.*, 2011). Em 2012, o DENV-4 foi encontrado tanto em amostras de pacientes atendidos em Vitória quanto em amostras de *Aedes aegypti* capturados na cidade (Comunicação pessoal).

A transmissão do DENV por artrópodes foi primeiramente sugerida por Graham em 1903, o qual pensava que o vetor poderia ser o *Culex fatigans*. A transmissão da doença pelo *Aedes aegypti* foi descrita pela primeira vez por Bancroft, em 1906, e foi confirmada posteriormente por Clealand e colaboradores (Cox, 1996). Além do *A. aegypti*, o *A. albopictus* já foi responsável por algumas epidemias de dengue, as quais aconteceram principalmente em território asiático. Estas poucas epidemias relacionadas à transmissão pelo *A. albopictus* foram essencialmente de dengue clássico, tendo sido observados poucos casos graves (Lambrechts *et al.,* 2010). A despeito dessas epidemias, o *A. albopictus* é considerado um vetor ineficiente do DENV, pois não é tão bem adaptado ao ambiente doméstico urbano e tão antropofílico quanto *A. Aegypti* (Rodhain & Rosen, 1997).

Outras espécies do gênero *Aedes*, tais como *A. polynesiensis* e *A. scutellaris* já foram especulados como possíveis transmissores do DENV, porém somente o *A. aegypti* possui importância epidemiológica e é o único relacionado como transmissor nas Américas (Cox, 1996; Consoli & Lourenço – de – Oliveira, 1994). Este vetor encontra nas áreas residenciais, urbanas e periurbanas, todas as condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento e proliferação. Suas fêmeas realizam a oviposição em locais com água parada e limpa e picam os humanos predominantemente durante o período diurno. Existem dois picos de atividade do *A. aegypti*: no começo da manhã, duas a três horas após o nascer do sol, e ao entardecer (Gubler,1998). Aumentos significativos na população de larvas dos mosquitos são observados durante os períodos chuvosos. Talvez seja esta a razão pela qual as

epidemias de dengue tendem a coincidir com estações úmidas (Thavara *et al.*, 2001). Além disso, trabalhos demonstram que a carga viral presente em mosquitos está diretamente associada às condições ambientais, sendo estas maiores em períodos quentes e úmidos (Thu *et al.*, 1998). Como as fêmeas geralmente picam várias pessoas até completar seu ciclo gonotrófico, podem transmitir o vírus diversas vezes em um curto período de tempo. Devido às características de seu vetor, a dengue é uma doença predominantemente de áreas tropicais e subtropicais (Gubler, 1998).

Devido à falta de tratamento específico e de vacinas disponíveis comercialmente, o controle do mosquito vetor é a primeira opção para a prevenção e contenção de epidemias de dengue (Garcia-Rejon *et al.*, 2008). O *A. aegypti* foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfego de escravos. Devido à sua importância como vetor da febre amarela, foi intensamente combatido em nosso território (Consoli & Lourenço – de – Oliveira, 1994). Uma das primeiras campanhas realizadas no país ocorreu no Rio de Janeiro, entre 1902 e 1907, e foi idealizada por Oswaldo Cruz, o qual instituiu brigadas sanitárias para eliminar os focos de *A. aegypti* e diminuir a transmissão da febre amarela urbana. Desde então, ocorreram inúmeras outras campanhas em prol do combate e eliminação do mosquito, tendo sido, este, considerado erradicado do território nacional diversas vezes até a década de 1970. Em 1976, entretanto, o *A. aegypti* retornou ao Brasil, devido às falhas na vigilância epidemiológica e às mudanças sociais e ambientais decorrentes da urbanização acelerada dessa época (Braga & Valle, 2007).

Atualmente, as medidas de controle da doença no Brasil são ditadas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), implantado pelo Ministério da Saúde em 2002. Segundo o PNCD, a vigilância epidemiológica da dengue está baseada em quatro subcomponentes:

1. Vigilância de casos, o que consiste na detecção em momento oportuno dos casos e orientação para medidas de controle apropriadas;
2. Vigilância laboratorial, que consiste na capacidade de diagnóstico laboratorial dos casos;
3. Vigilância em áreas de fronteira, cujo objetivo é a detecção precoce da introdução de novos vírus/cepas nas regiões de fronteiras;

4. Vigilância entomológica, tendo como objetivo principal o monitoramento dos índices de infestação por *Aedes aegypti* para subsidiar a execução das ações apropriadas de eliminação dos criadouros de mosquitos (MS, 2002).

A vigilância entomológica baseia-se principalmente na pesquisa de formas imaturas do vetor, como larvas e ovos. Atualmente, diferentes metodologias tem sido empregadas, como a vigilância de pontos estratégicos, realizada quinzenalmente e o Levantamento Rápido de Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAa), realizado bimestralmente. O LIRAa trata-se, fundamentalmente, de um método de amostragem para a obtenção de indicadores entomológicos, tais como índices de infestação predial (IIP), o qual é a porcentagem de edifícios positivos para larva, o e índice de Breteau (IB), que consiste no índice de porcentagem de recipientes positivos com larvas por casa (MS, 2009; Gomes,1998). Além destas metodologias, pode ser utilizada também a pesquisa de ovos de *A. aegypti* por meio de armadilhas conhecidas como Ovitraps®. A pesquisa de ovos, entretanto, é mais indicada para períodos em que há baixa densidade de mosquitos, e somente permite a quantificação de ovos depositados, sem ser possível estimar a densidade populacional de vetores em determinada área (Focks, 2003).

Recentemente, uma nova metodologia, denominada MI – Dengue (Sistema Computadorizado para o Monitoramento Inteligente da Dengue), tem se mostrado útil para o monitoramento em larga escala do mosquito vetor. Neste sistema, armadilhas (Mosquitrap®) localizadas em vários pontos da cidade atraem mosquitos adultos, especialmente fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, por meio de um atrativo sintético (AtrAedes, Ecovec Ltda., Belo Horizonte, Brasil). Os vetores, então, ficam presos em cartões adesivos contidos nas armadilhas, o que possibilita a sua captura e identificação. Em relação ao sistema computadorizado do MI-Dengue, este consiste em gravar os dados de campo da Mosquitrap® com uma planilha eletrônica e um software específico (Geo-Dengue, Ecovec Ltda, Belo Horizonte, Brasil). Esse sistema permite enviar e tornar disponíveis *on-line*, para os gestores municipais de saúde, os dados obtidos, afim de que possam acessar, de acordo com a semana epidemiológica, a densidade de fêmeas do vetor. Assim, o MI-Dengue possibilita o conhecimento rápido das regiões infestadas pelo mosquito na cidade, o que implica no direcionamento das medidas de controle em áreas urbanas (Eiras & Resende

2009; Melo *et al*., 2012). Desde sua criação, em 2002, o sistema tem sido adotado em 35 cidades brasileiras, incluindo Vitória (Ecovec, 2012).

O controle da densidade do vetor, em suas formas imaturas tais como larvas e ovos ou nas formas adultas, tem sido objeto de vários estudos, os quais se propõem a entender a interação temporal e / ou espacial entre mosquitos e indivíduos portadores de dengue. A despeito da associação teórica entre abundância de vetores e risco de transmissão de dengue, a natureza quantitativa desta relação ainda é pobremente entendida (Thammapalo *et al.*, 2008). Portanto, o conhecimento da epidemiologia da dengue ainda requer estudos que integrem dados epidemiológicos e entomológicos (Honório *et al.*, 2009).

Nesse contexto, vários foram os estudos feitos para se conhecer melhor a relação vetor – indivíduos com dengue. Em se tratando da distribuição de vetores e pacientes no ambiente, em alguns estudos, não foi encontrada associação entre ocorrência espacial de larvas ou mosquitos adultos e casos humanos da doença (Barbosa & Lourenço 2010; Honório *et al.,* 2009), enquanto em outros, altas densidades larvárias estavam espacialmente associadas com casos de dengue (Cordeiro *et al.,* 2011).

Um trabalho realizado em vilarejos da Tailândia, ao comparar índices entomológicos de *clusters* de crianças com dengue e *clusters* de crianças com outras doenças febris, verificou que, em média, o número de pupas de *A. aegypti* por pessoa era maior onde havia indivíduos com dengue (Mammen Jr., 2008). Outro estudo, realizado na cidade do Rio de Janeiro, demonstrou que áreas mais ricas possuem índices menores de infestação e menor sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti,* sugerindo um menor risco de transmissão de dengue em comparação com áreas suburbanas e favelas (David *et al.*, 2009).

Em se tratando da relação temporal entre vetores e epidemias de dengue, já foi demonstrado que aumentos nos índices larvários precedem, em aproximadamente dois meses, o aumento do número de casos humanos da doença (Barbosa & Lourenço, 2010). Outro trabalho, realizado na cidade de Porto Sudão, às margens do Mar Vermelho, mostrou que os dois picos de confirmação de casos de dengue por IgM estudados foram precedidos por picos nos índices vetoriais (Seidahmed*et al.*,

2012). Entretanto, um estudo realizado de três diferentes regiões do Rio de Janeiro não observou uma relação temporal entre os índices entomológicos e o número de casos de dengue (Honório *et al.,* 2009).

Em Vitória, um estudo realizado a partir de dados entomológicos e epidemiológicos de 2000 a 2009, encontrou correlação positiva significativa entre o índice de infestação predial (IIP) produzido pelo Levantamento de Índice de um determinado mês e a incidência de dengue entre um e quatro meses seguintes. Entretanto, o mesmo estudo não encontrou correlação entre o IIP gerado através do LIRAa e a incidência de dengue (Cardoso *et al.*, 2010).

No sentido de avaliar diferentes metodologias de capturas de vetores para cálculos de índices entomológicos e sua correlação com a ocorrência de dengue, um estudo realizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, demonstrou que a captura de formas adultas de A. *aegypti*, por meio das Mosquitraps®, demonstrou resultados superiores para a sinalização de risco de transmissão de dengue, tanto espacial quanto temporal, quando comparada com metodologias que fazem uso de captura de outras formas evolutivas, como larvas e ovos (Melo *et al*., 2012).

Apesar de o monitoramento espacial e temporal dos focos de mosquitos ser uma importante ferramenta para a vigilância epidemiológica, ainda mais importante é o conhecimento da infecção dos mosquitos pelo DENV. Conhecer os sorotipos do vírus que circulam nos mosquitos vetores é importante, pois estes atuam como mantenedores do vírus no ambiente, sendo pelo ciclo mosquito – homem – mosquito ou pela transmissão transovariana (Guedes *et al.*, 2010). A detecção precoce de mosquitos infectados pode intensificar as medidas de controle ao vetor, objetivando, assim, a redução da transmissão da doença. A identificação dos sorotipos tem se mostrado importante na determinação da magnitude das epidemias, visto que mudanças no sorotipo circulante foram associadas a um maior número de casos da doença, sendo, por este motivo, de grande relevância epidemiológica (Gubler, 1998). No Brasil, poucos foram os estudos feitos visando a detecção dos sorotipos circulantes em mosquitos (Lourenco-de-Oliveira *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.,* 2005; Pessanha *et al.*, 2011; Zeidler *et al.,* 2008; Martins *et al.* 2012), e essa prática, apesar de importante, não faz parte da rotina de vigilância na grande maioria das cidades.

Como o entendimento da epidemiologia da dengue baseia-se tanto em estudos epidemiológicos quanto em estudos entomológicos, conhecer somente a localização dos focos de infestação de mosquitos é insuficiente, sendo necessário também conhecer a distribuição dos casos humanos de dengue. Isso deve ao fato do risco para epidemias de dengue ser influenciado não somente pela abundância de fêmeas de *A. aegypti*, mas também pela imunidade sorotipo – específica entre a população local (Eisen & Lozano-Fuentes, 2009).

Devido às suas características geográficas, Vitória apresenta condições altamente favoráveis para a transmissão da doença e, portanto, encontra - se na lista dos 657 municípios brasileiros prioritários para o controle da dengue do Programa Nacional de Controle da Dengue do Ministério da Saúde (MS, 2002).

Desde 2008, o controle entomológico do vetor da dengue na cidade de Vitória tem utilizado como ferramenta adicional ao PNCD, o MI-Dengue e a detecção de mosquitos infectados capturados pelas armadilhas (Mosquitrap®) distribuídas em toda a cidade, bem como a identificação dos sorotipos circulantes. Entretanto, até o momento nenhum estudo foi desenvolvido no sentido de avaliar a correlação entre a densidade de formas adultas do vetor, bem como a presença de mosquitos infectados e a incidência da doença na cidade. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar essa correlação e os sorotipos circulantes durante a epidemia de dengue ocorrida no ano de 2011, em Vitória, Espírito Santo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a correlação entre densidade de vetores e presença de mosquitos infectados com a ocorrência de dengue em Vitória durante a epidemia de 2011.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o perfil sociodemográfico e as características clínicas dos indivíduos acometidos pela doença;
- Avaliar a correlação temporal e espacial entre densidade de fêmeas de *A. aegypti* e o número de casos de dengue;
- Avaliar a correlação entre a presença de mosquitos infectados e a incidência de dengue;
- Identificar os sorotipos circulantes do DENV em indivíduos portadores da doença e em *A. aegypti* capturados na cidade.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo em dezembro de 2009 (Processo 103/09). Além disso, este projeto também obteve a autorização da Prefeitura Municipal de Vitória para o acesso às informações de notificação e dos dados do MI-Dengue, por meio do protocolo número 17091/2012.

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo foi um estudo ecológico envolvendo o geoprocessamento dos casos de dengue, da densidade de vetores e da ocorrência de *A. aegypti*infectados por DENV no município de Vitória, além da descrição dos sorotipos virais circulantes na cidade e dos aspectos demográficos e clínicos dos indivíduos diagnosticados com dengue.

3.3 LOCAL DE ESTUDO

Vitória, capital do Espírito Santo, está situada na latitude 20º19’15’’ sul e longitude 40º20’10’’ oeste, e possui uma área territorial de 98,50km^2, estando a apenas 3 metros acima do nível do mar. Seu território, dividido em 79 bairros e oito regiões, é constituído de uma ilha principal e uma área continental, situada ao norte, além de ilhas menores ao seu entorno. Suas regiões são: Região I – Centro; Região II – Santo Antônio; Região III – Bento Ferreira; Região IV – Maruípe; Região V – Praia do Canto; Região VI – Continente, Região VII – São Pedro e Região VIII – Jardim Camburi. Seu clima é tropical úmido, com pluviosidade média de 1.153 mm/ano. As temperaturas médias na cidade são de 34.4 ºC e 24.4 ºC, no verão e no inverno, respectivamente. De acordo com o Censo de 2010, sua população é de 327.801 habitantes, com densidade demográfica de 3.327 habitantes / km^2 (IBGE, 2012; PMV, 2012). O índice

de desenvolvimento humano (IDH) da cidade é o terceiro maior entre as capitais brasileiras, sendo de 0,856 (IBGE, 2000).

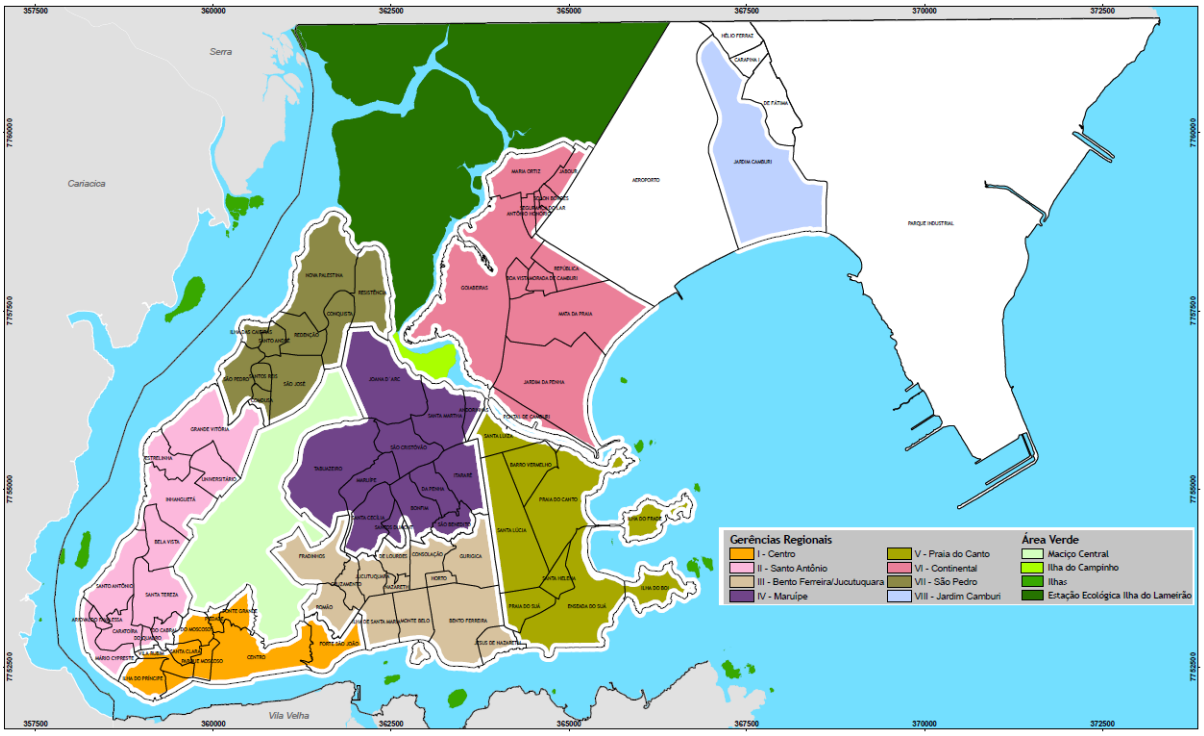

Figura 3: Divisão das gerências regionais de Vitória, Espírito Santo. Extraído de PMV, 2012.

3.4 PERÍODO DE ESTUDO

Foram analisados os casos confirmados de dengue, ocorridos entre 01/01/2011 e 31/12/2011, com diagnóstico laboratorial realizado pelo Laboratório Central da PMV, bem como os dados referentes à ocorrência de *A. aegypti*, fornecidos pelo programa MI-DENGUE, durante o mesmo período.

3.5 POPULAÇÃO DE ESTUDO

3.5.1 POPULAÇÃO HUMANA

Em 2011, foram notificados 8.713 casos de dengue em Vitória. No Brasil são notificados todos os casos suspeitos de dengue que se enquadram nos critérios preconizados pelo Ministério da Saúde (febre aguda acompanhada de pelo menos dois sintomas como cefaleia, dor retro - orbitária, mialgia, artralgia, prostração ou exantema) (MS, 2006) independente da confirmação laboratorial.

Dos 8.713 casos notificados no período em questão, 2.876 foram confirmados pelo Laboratório Central da PMV, por meio da pesquisa de IgM ou NS1. Dos 2.876 casos confirmados, foram resgatados os dados de 2.333 (81,11%) no Sistema Nacional de Agravos de Notificação - SINAN (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde) os quais constituíram a população final deste estudo.

3.5.2 POPULAÇÃO DE MOSQUITOS

Para analisar as questões referentes à densidade semanal de *A. aegypti* em Vitória, bem como a ocorrência da infecção dos mosquitos vetores pelo vírus DENV, foram analisados os dados fornecidos pelo programa MI – DENGUE. Em Vitória, há 1.410 armadilhas do MI – DENGUE distribuídas estrategicamente por todo o território da cidade.

As armadilhas utilizadas, Mosquitraps, capturam mosquitos adultos, especialmente fêmeas grávidas (e, raramente, espécimes nulíparas), devido ao uso de um atraente sintético estimulador de ovoposição (AtrAedes), desenvolvido a partir de infusões de grama. Os mosquitos são capturados por um cartão adesivo, onde ficam inicialmente presos e podem ser facilmente identificados (Eiras & Rezende, 2009).

Estas armadilhas consistem em um container preto (33 centímetros de altura por 15 centímetros de largura), preenchido por aproximadamente 300mL de água e um cartão adesivo, embebido com o AtrAedes, que apreende os mosquitos capturados.

As Mosquitraps são posicionadas a uma altura máxima de 1,5m a partir do chão, protegidas de sol e chuva, e fora do alcance de animais domésticos e crianças. (Melo *et al.*, 2012).

Estas armadilhas são vistoriadas semanalmente pelos agentes de saúde, e o número de fêmeas de *A. aegypti* capturadas é enviado para o sistema *online* do MI – DENGUE. Quinzenalmente, as fêmeas capturadas na semana são preservadas em solução de guanidina e enviadas para o Núcleo de Doenças Infecciosas para a análise da presença de vírus Dengue.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES

A fonte de dados epidemiológicos utilizada foi o SINAN. As seguintes variáveis foram analisadas: sexo, idade (estratificada em: até 5 anos, de 6 a 17 anos, de 18 a 39 anos de 40 a 59 anos e acima de 60 anos), cor da pele (branca, preta, parda e outras, onde foram alocados os indivíduos que se consideraram indígenas ou amarelos), nível de escolaridade (estratificado em: baixa escolaridade – quando o indivíduo não havia estudado ou não havia completado o ensino fundamental, Ensino Fundamental (EF) completo, Ensino Médio (EM) completo e Ensino Superior (ES) completo), classificação da forma clínica da doença em Dengue Clássica, Dengue com Complicações, Febre Hemorrágica da Dengue e Síndrome do Choque da Dengue (de acordo com os critérios estabelecidos pelo MS, 2007), ocorrência de hospitalização e desfecho do quadro (cura, óbito por dengue ou óbito por outras causas). Para se conhecer o perfil da população acometida por dengue em Vitória, em 2011, foram calculadas as freqüências de cada variável sociodemográfica ou clínica, com auxílio do programa Stata, versão 12.0.

3.7 ANÁLISE TEMPORAL DOS CASOS DE DENGUE E DENSIDADE DE *A. aegypti*

Para avaliar a relação temporal entre o número de casos de dengue e a densidade de fêmeas de *A. aegypti* capturadas, contabilizou-se o número de casos de dengue

confirmados laboratorialmente por semana e calculou-se índice médio de fêmeas de *A. aegyti* semanal (IMFA). O cálculo do IFMA foi realizado da seguinte forma:

$$\mathrm{IMFA}_{\mathrm{semanal}} = \frac{\text{número de fêmeas de } A.\,aegypti \text{ capturadas na semana}}{\text{número de armadilhas vistoriadas na semana}}$$

De acordo com o MI-dengue, IMFA de até 0,15 é considerado “satisfatório”; valores entre 0,15 e 0,3 são considerados como “moderado”; valores entre 0,3 e 0,6 são considerados “alerta” e valores acima de 0,6 são considerados como “crítico” (Ecovec, 2012).

Com o objetivo de se avaliar se o aumento no número de casos de dengue era precedido de um aumento na densidade de *A. aegypti*, indicada pelo IMFA, foi realizado o teste de Correlação Cruzada, utilizando-se o Programa R, versão 2.13.2.

Para se avaliar a relação entre a densidade de vetores e variáveis climáticas, foram calculadas as temperaturas médias e umidade relativa do ar mensais, bem como a precipitação pluviométrica total de cada mês. Estes cálculos foram feitos a partir dos dados cedidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper).

3.8 GEOPROCESSAMENTO DOS CASOS HUMANOS, DA DENSIDADE DE VETORES E DA LOCALIZAÇÃO DAS ARMADILHAS CONTENDO *A. aegypti*INFECTADOS

Para se conhecer a distribuição espacial dos casos de dengue em Vitória, realizou-se o geoprocessamento, por bairro, dos casos humanos e da densidade de fêmeas de *A. aegypti*. A confecção dos mapas temáticos foi realizada a partir da malha digital do município de Vitória fornecido pela Gerência de Geoprocessamento da Subsecretaria de Tecnologia da Informação da Secretaria Municipal de Fazenda do Município de Vitória (SEMFA). Seguiu-se então o georreferenciamento dos dados utilizando o

Programa TerraView (versão 4.2.0). Uma vez obtido os endereços residenciais dos pacientes, foram calculadas as incidências acumuladas para cada bairro, dividindo-se o somatório de casos de dengue confirmados ocorridos em cada bairro pela sua respectiva população residente, multiplicando-se então o resultado por 100.000. Este cálculo está discriminado a seguir:

$$\text{Incidência anual acumulada} = \left[\frac{\text{número de casos confirmados de dengue no bairro}}{\text{população residente no bairro}}\right] \times 100.000$$

Os valores de incidências foram então divididos em 5 estratos: 0, 1 a 100 (incidência baixa), 100 a 300 (incidência média), 300 a 1000 e acima de 1000 (estes dois últimos indicam uma incidência alta). A escolha destes valores baseou-se nos valores preconizados pelo Ministério da Saúde para os cálculos com população de 100.000 habitantes (MSb, 2012).

O geoprocessamento da densidade de fêmeas de *A. aegypti* foi realizado utilizando-se o IMFA médio semanal de cada bairro, o qual foi calculado dividindo-se a somatória de todos os IMFA semanais de cada bairro pelo número de semanas epidemiológicas no ano, como demonstrado na fórmula a seguir:

$$\text{IMFA}_{\text{bairro}} = \frac{\sum \text{IMFA semanal de cada bairro}}{\text{Número de semanas no ano}}$$

Para avaliar se havia relação entre a incidência de dengue nos bairros e IMFA médio de cada bairro, foi realizado o Teste de Correlação de Pearson, no programa R (versão 2.13.2).

Além disso, foi realizado o greoprocessamento das armadilhas contendo *A. aegypti* infectados, por meio da confecção de um mapa de pontos. Para isso, obtiveram-se os endereços de cada armadilha. Com a ajuda do programa Google Earth (versão 6.2.2.6613 para Windows), foram pesquisadas as latitudes e longitudes

correspondentes a cada endereço e estas, por sua vez, foram convertidas em coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator). Assim, o sistema de coordenadas utilizado foi o UTM, zona 24, SAD 69. A confecção do mapa de ponto também foi realizada no programa Terraview (Versão 4.2.0).

Para se comparar a taxa de incidência entre bairros com e sem presença de mosquito infectado, foi utilizado o Teste T de Médias. Para isso, foi realizado primeiramente o Teste de Kolmogorov-Smirnov, a fim de se verificar a normalidade dos dados. Após esta etapa, realizou-se o Teste F para verificar a igualdade de variâncias. A partir dos resultados destes dois testes preliminares, fez-se o Teste T para verificar a igualdade de taxas de incidência nos dois grupos de bairros, supondo variâncias desiguais. Estes testes foram feitos no programa R (versão 2.13.2).

3.9IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS VIRAIS CIRCULANTES

3.9.1 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS EM AMOSTRAS HUMANAS

Para a detecção dos sorotipos do DENV, foram utilizados soros de 261 pacientes com suspeita clínica de dengue com até cinco dias do início dos sintomas, atendidos nos Postos de Pronto Atendimento da Prefeitura Municipal de Vitória. No momento da consulta médica, o sangue foi coletado em tubo a vácuo, sem anticoagulante, enviado para o Laboratório Central da PMV e centrifugado para a obtenção do soro. Os soros foram aliquotados, sendo uma alíquota utilizada para a pesquisa da proteína NS1 e a outra, armazenada em freezer -70º C e, posteriormente, enviadas em gelo para o Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), na Universidade Federal do Espírito Santo, onde permaneceram armazenados em freezer -70º C, até o momento da extração do RNA.

3.9.1.1 PESQUISA DA PROTEÍNA NS1 EM SORO

Para a otimização dos ensaios de detecção dos sorotipos virais, os soros foram triados para a presença de NS1, indicativo de dengue aguda, antes de serem enviados ao

NDI. Essa triagem foi feita utilizando-se o kit Dengue Early Teste Rápido PanBio® (Brisbane, Austrália), o qual consiste em um ensaio imunocromatográfico para a detecção qualitativa do antígeno NS1.

3.9.1.2 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O RNA viral foi extraído a partir de 140µL de soro utilizando o Kit QIAamp viral RNA (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA obtido foi então eluído em 60µL de tampão AVE (pertencente ao kit) e imediatamente submetido à reação de RT-PCR para a obtenção do cDNA. O RNA restante foi armazenado em freezer (-70ºC).

3.9.1.3 SÍNTESE DO CDNA

A transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita utilizando-se a enzima Cloned AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen®). O cDNA foi sintetizado a partir de 5µL do RNA extraído e 15µL de um mix contendo 20 mM de nucleotídeos, 20 pmol do iniciador D2 , 0,1M DTT, 40U de inibidor de RNAses, 1,5U da enzima RT-AMV, 4,0µL de tampão de hibridização, 8,0mM de Mge 2,9µL de água ultrapura. A mistura então foi aquecida a 42ºC por 60 minutos.

3.9.1.4 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A amplificação do cDNA foi feita de acordo com o protocolo proposto por Lanciotti *et al.* (1992), com algumas modificações. 1**,**0µL do cDNA obtido na reação anterior foi adicionado a um mix de volume 19,0µL, contendo: 2,0µL de tampão 10X, 30mM de $MgCl_2$, 4mM de nucleotídeos,10 picomol de cada iniciador D1 e D2, 1,25 U da enzima Taq Polimerase (Invitrogen) e 13,75µL de água ultrapura. A mistura, então, foi submetida a ciclos de variação de temperatura, como a seguir: 1 ciclo de 3 minutos a 94ºC para desnaturação, 30 ciclos de 94ºC por 35 segundos, 56ºC por 1 minuto e

72ºC por 2 minutos para desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente, e 1 ciclo de 72ºC por 10 minutos para extensão. Na tabela 1, estão demonstradas as sequencias de bases de cada iniciador, bem como o tamanho, em pares de bases, dos produtos amplificados.

3.9.1.5 SEMI – NESTED PCR

Para a detecção dos sorotipos virais presentes em cada amostra, o produto de PCR foi diluído na proporção 1:100 em água milli-Q autoclavada. 4,0µL do produto diluído foram então adicionados ao meio de reação com composição semelhante ao utilizado na PCR, exceto em relação aos iniciadores: O iniciador D1 foi mantido, porém o iniciador D2 foi substituído por iniciadores sorotipo-específicos, TS1, TS2, TS3 e TS4. O programa utilizado para a reação foi: 1 ciclo de 3 minutos a 94ºC para desnaturação, 18 ciclos de 94ºC por 35 segundos, 56ºC por 1 minuto e 72ºC por 2 minutos para desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente, e 1 ciclo de 72ºC por 10 minutos para extensão. Os produtos da reação de Semi-Nested PCR foram detectados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo.

Tabela 1: Seqüência dos iniciadores utilizados e tamanho, em pares de bases (bp), dos produtos amplificados.

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

3.9.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS VIRAIS EM AMOSTRAS DE MOSQUITOS

Quinzenalmente, os agentes de saúde da PMV enviavam ao Laboratório de Dengue do NDI os mosquitos capturados em armadilhas Mosquitrap®, distribuídas por todo o território da cidade de Vitória, armazenados em solução de guanidina. Cada tubo possuía um número de registro e correspondia a uma única armadilha. Os tubos recebidos foram cadastrados no site do MI-Dengue e, de acordo com a localização das armadilhas, foram agrupados em lotes. Cada lote continha até 20 mosquitos pertencentes a armadilhas próximas geograficamente.

Após o registro dos tubos, os mosquitos foram agrupados em um mesmo microtubo de 1,5 mL, de acordo com o lote aos quais pertenciam. Cada tubo continha 250uL de solução de lise (Guanidina, Trizol, Tris). Após o agrupamento dos lotes, os mosquitos foram macerados com auxílio de micropistilos, até que a solução se tornasse homogênea. A partir desta solução, foi feita a extração do RNA.

3.9.2.1 EXTRAÇÃO DE RNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE MOSQUITOS

A extração do RNA foi feita de acordo com o método proposto por Boom *et al.* (1990). Para isso, adicionou-se 650µL de solução de lise às amostras de mosquitos previamente maceradas. A solução foi então homogeneizada por 10 segundos, e deixada em repouso por pelo menos 1 hora.

Após o repouso, a solução foi centrifugada a 16.000 rpm por 6 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então transferido para novos microtubos de 1,5mL, nos quais foram adicionados 40µL de solução de sílica. A solução foi homogeneizada por 10 segundos, colocada por 20 minutos em homogeneizador basculante e centrifugada a 5.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, foram realizadas três etapas sucessivas de lavagem, sendo a primeira com 750µL de solução de lavagem, a segunda com 750µL de etanol 70% gelado e, a terceira, com 500µL de acetona gelada. Após cada uma dessas lavagens, a solução era homogeneizada manualmente, centrifugada a 5.000 rpm por 3 minutos e fazia-se o descarte do sobrenadante. Os microtubos foram aquecidos a 56ºC por 10 minutos, para a evaporação do solvente. Após a evaporação

completa, adicionou-se a cada microtubo 50 µL de água Milli-Q (pré-aquecida a 56ºC), e a solução foi homogeneizada manualmente. Foi feita então uma incubação de 15 minutos a 56ºC em termobloco. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação a 16.000 rpm por 6 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o RNA foi então aliquotado em microtubo de 0,5mL. O RNA extraído foi imediatamente utilizado para a confecção do cDNA e, o restante, foi armazenado em freezer -70°C.

3.9.2.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA EM cDNA

A transcrição reversa do RNA em cDNA foi feita utilizando-se a enzima High Capacity (Applied Biosystems®). Para isso, 10,0µL de RNA foram adicionados a 10,0µL de uma mistura contendo 2,0µL de tampão 10x, 50pmol de iniciador D2, 8,0 mM de dNTPs, 1,0U de transcriptase reversa High Capacity e 1,2µL de água DEPC. O meio de reação foi então submetido um ciclo de 25°C por 10 minutos, seguido por um ciclo de 37ºC por 120 minutos e um ciclo de 85ºC por 5 minutos. O cDNA obtido foi então submetido à amplificação e tipagem, por meio dos ensaios de PCR e Semi-Nested PCR, de forma semelhante ao realizado para as amostras humanas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES

Dos 8.713 casos notificados no período do estudo, 2.876 foram confirmados pelo Laboratório Central da PMV, por meio da pesquisa de IgM. Dos 2.876 casos confirmados, foram resgatados os dados de 2.333 (81,11%) no Sistema Nacional de Agravos de Notificação - SINAN (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde) os quais constituíram a população final deste estudo.

Nesta população, foi observada uma ligeira predominância do sexo feminino em relação ao masculino (54,27% e 45,73%, respectivamente). Em se tratando da cor da pele, a cor parda foi observada com maior freqüência na população estudada (41,15%), seguida da cor branca (30,34%). Indivíduos que se declararam negros contabilizaram 8,40% da amostra e 2,05% se autodeclararam indígenas ou amarelos (aqui agrupado como “outros”). Em 419 casos (18,06%), a classificação quanto à cor da pele foi ignorada no momento da notificação.

A idade dos indivíduos variou de 3 meses a 92 anos, sendo a média de 29,6 anos (DP: 18,49) e a mediana de 27 anos. Foi observada que a maioria da população acometida por dengue em Vitória, em 2011, era constituída de indivíduos acima de 18 anos (64,18%). As freqüências de cada faixa etária estão discriminadas na tabela 2.

No que diz respeito à escolaridade, 654 indivíduos (28,03%) foram classificados como tendo baixa escolaridade; 298 indivíduos (12,77%) haviam completado o Ensino Fundamental; 406 indivíduos (17,40%) possuíam Ensino Médio completo e 155 (6,64%) possuíam curso superior concluído. Em 820 casos (35,52%) as informações referentes ao grau de escolaridade não foram preenchidas na notificação (Tabela 2).

Tabela 2: Características sociodemográficas dos pacientes portadores de dengue residentes em Vitória, ES, no ano de 2011.

Características sociodemográficas	N (%)
Sexo	
Feminino	1.266 (54,27%)
Masculino	1.067 (45,73%)
Cor da pele	
Branca	710 (30,34%)
Preta	196 (8,40%)
Parda	960 (41,15%)
Outras	48 (2,05%)
Ignorado	419 (18,06%)
Idade	
Até 5 anos	111 (4,75%)
6 a 17 anos	725 (31,07%)
18 a 39 anos	772 (33,09%)
40 a 59 anos	563 (24,13%)
60 ou mais	162 (6,96%)
Escolaridade	
Baixa	654 (28,03%)
Ensino Fundamental completo	298 (12,77%)
Ensino Médio completo	406 (17,40%)
Ensino Superior completo	155 (6,64%)
Ignorado	820 (35,52%)

Com relação à forma clínica apresentada pelos pacientes avaliados, os dados mostraram que a grande maioria dos casos confirmados (90,74%) foram classificados como Dengue Clássica, enquanto 6,60% foram classificados como Dengue com Complicações e 2,66% foram classificados como Febre Hemorrágica da Dengue. Nenhum caso de Síndrome do Choque da Dengue foi documentado. A ocorrência de hospitalização foi observada em 8,23% dos indivíduos, sendo que apenas dois casos de óbito foram descritos. Estes dados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Aspectos clínicos da dengue ocorrida em Vitória em 2011.

Aspectos clínicos	N (%)
Classificação da Forma Clínica	
Dengue Clássica	2117 (90,74%)
Dengue com Complicações	154 (6,60%)
Febre Hemorrágica da Dengue	62 (2,66%)
Síndrome do Choque da Dengue	0 (0)
Ocorrência de Hospitalização	
Sim	192 (8,23%)
Não	1811 (76,62%)
Não informado	330 (15,15%)
Desfecho	
Cura	2186 (93,69%)
Óbito por dengue	2 (0,08%)
Óbito por outras causas	0 (0)
Informação não preenchida	145 (6,23%)

4.2 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE DE VETORES E CASOS DE DENGUE

4.2.1 CORRELAÇÃO TEMPORAL

Com o objetivo de descrever o comportamento da densidade de fêmeas de *A. aegypti* e o número de casos humanos de dengue, durante o ano de 2011, foi feita a distribuição mensal do número de casos e do IFMA (Figura 4).

Considerando os valores de IMFA até 0,15 como satisfatórios, entre 0,15 e 0,30 como moderados, de 0,30 a 0,60 como alerta e acima deste como críticos pode-se perceber que durante todo o ano a densidade de mosquito em Vitória manteve-se acima dos níveis satisfatórios. Nos meses de janeiro, fevereiro e abril, foram detectados níveis críticos de IMFA. De junho a outubro, a densidade média de vetores mensal foi considerada como moderada, retornando ao nível de alerta nos meses de novembro e dezembro.

Com relação aos casos de dengue, o período de detecção compreendeu os meses de janeiro a julho, com o pico do número de casos ocorrendo no mês de maio, e foi precedido por aumento na densidade de vetores. A partir de julho, houve detecção esporádica de casos até o final do ano, coincidindo com a queda na densidade de vetores.

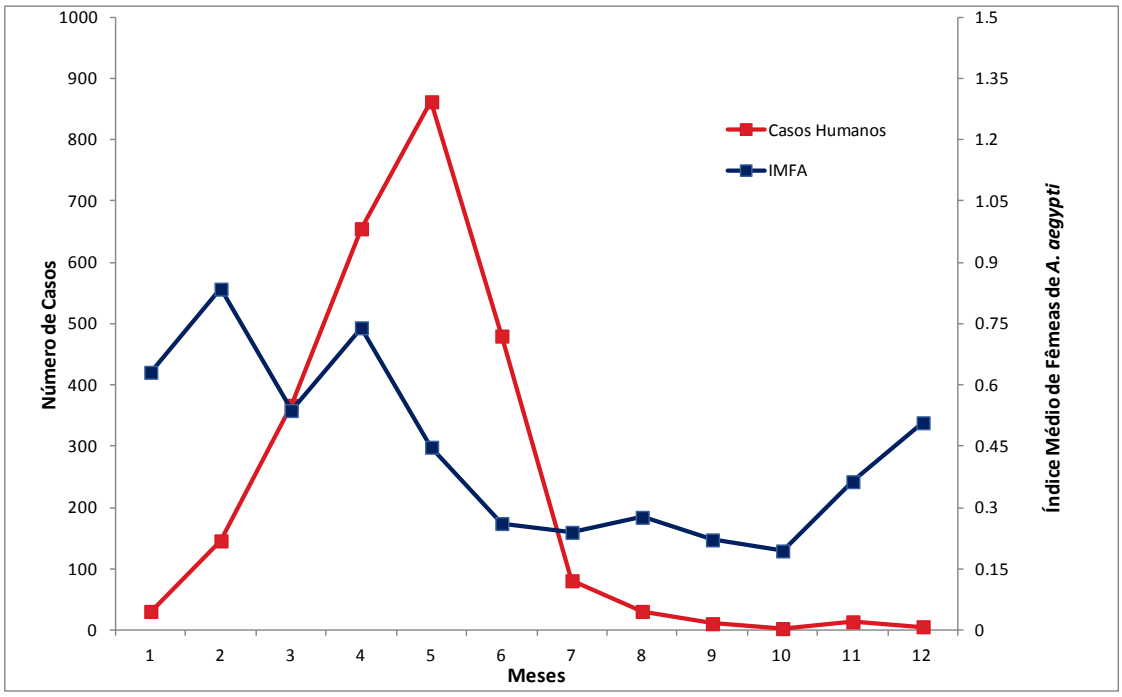

Figura 4: Número de casos de dengue e Índice Médio de Fêmeas de *A. aegypti* (IMFA), por mês, detectados durante o ano de 2011 em Vitória.

Para avaliar a correlaçãotemporal entre o aumento da densidade de vetores e o aumento do número de casos foi realizada a análise de correlação cruzada (Figura 5). Os resultados mostraram que a correlação entre o IMFA e o número de casos humanosé observada a partir de um intervalo de 2 semanas entre as 2 variáveis, e o valor desta correlação atinge um pico máximo por volta de 4 semanas de intervalo. Ou seja, o aumento na densidade de vetores precede, em aproximadamente um mês, o aumento do número de casos.

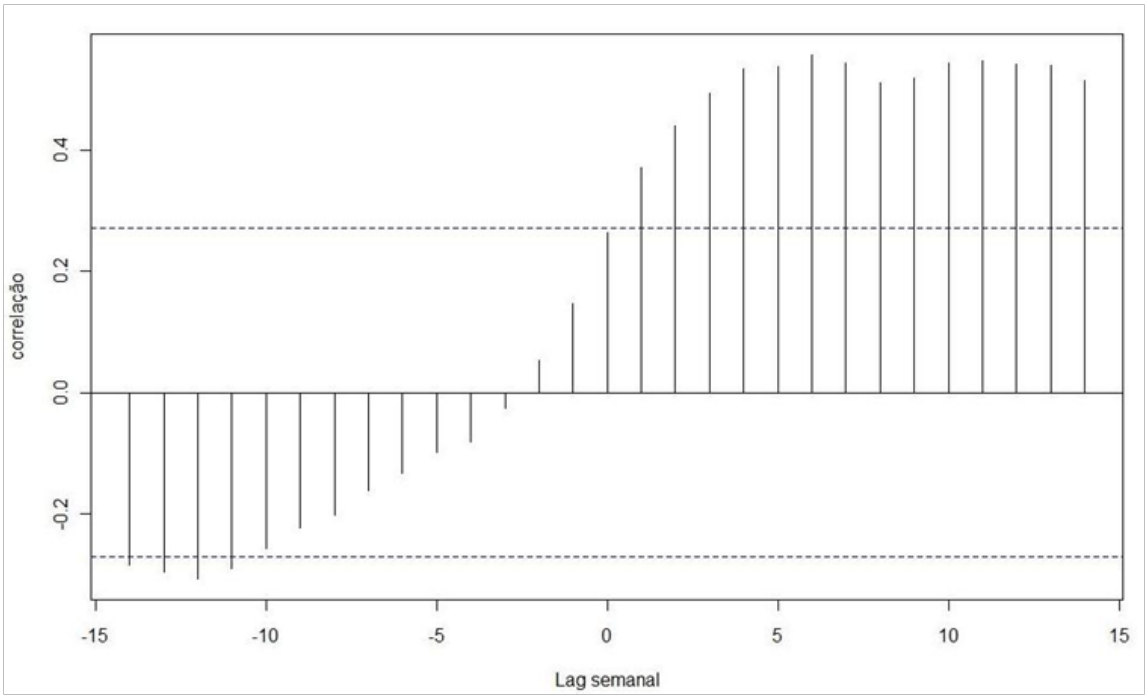

Figura 5: Correlação cruzada entre o IMFA semanal e o número de casos de dengue por semana.

Uma vez observada a relação entre a densidade de vetores e o número de casos de dengue, analisou-se também a relação entre a densidade de vetores e as variáveis climáticas. Em Vitória, em 2011, observa-se que o períodos de maior precipitação pluviométrica corresponderam aos meses de março e abril e entre outubro e dezembro, sendo o maior valor encontrado em abril (419,4 mm). Em relação à temperatura, os maiores valores foram observados entre os meses de janeiro e abril e, em relação à umidade relativa do ar, foi observado um período de maior umidade do ar entre os meses de fevereiro e abril e entre outubro e dezembro.

Com base nestes dados, nota-se que os maiores valores de IMFA foram observados nos meses quentes e chuvosos. A representação gráfica das variáveis climáticas e do IMFA durante os meses de 2011 está demonstrada na Figura 6.

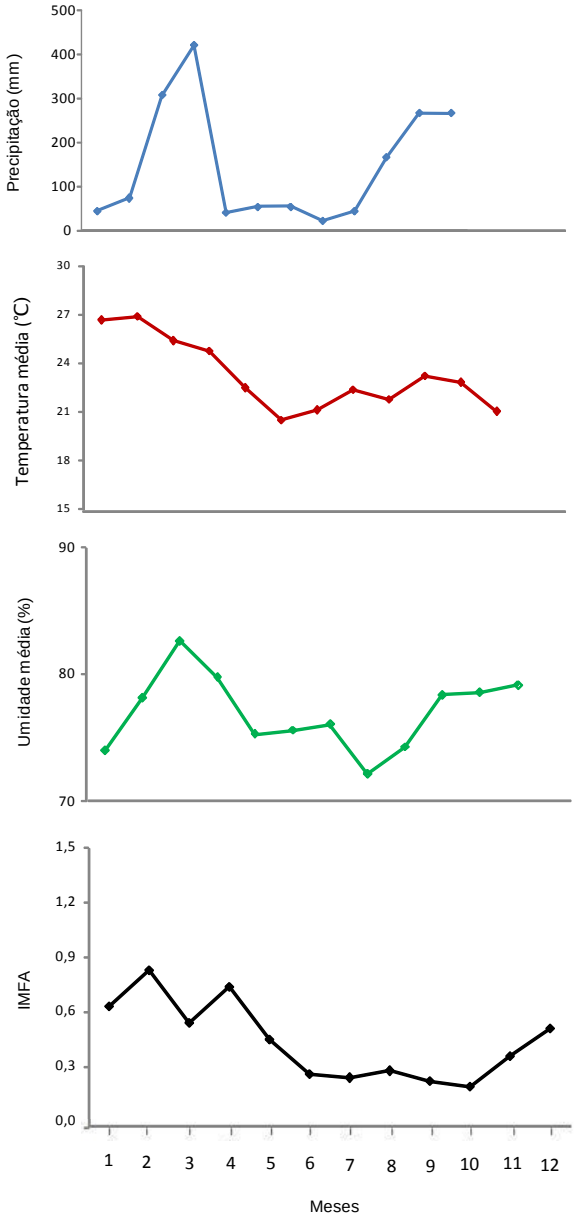

Figura 6: Variáveis climáticas e densidade de vetores em Vitória, 2011.

4.2.2 CORRELAÇÃO ESPACIAL

Para avaliar a distribuição dos casos de dengue por bairro, foi calculada a incidência anual da doença por 100.000 habitantes para cada bairro da cidade. Como observado na figura 6, 24 bairros da cidade apresentaram valores anuais de incidência de dengue acima de 1.000 casos / 100.000 habitantes. Destes, 18 pertencem às gerências regionais de São Pedro, Santo Antônio e Maruípe. Vinte e sete bairros apresentaram valores de incidência para dengue entre 300 e 1.000 casos/ 100.000 habitantes. Vale

ressaltar que, de acordo com o Ministério da Saúde, valores de incidência acima de 300 / 100.000 habitantes são considerados altos. Portanto, em Vitória, em 2011, dos 79 bairros, 51 apresentaram alta incidência de dengue. Valores de incidência média (entre 101 e 300 casos / 100.000 habitantes) foram encontrados em 16 bairros da cidade e apenas 12 apresentaram incidência baixa de dengue. Dentre estes bairros com baixa incidência da doença, encontram-se os bairros Praia do Canto, Mata da Praia, Ilha do Boi, Ilha do Frade e Pontal de Camburi. Estes resultados estão demonstrados na Figura 7.

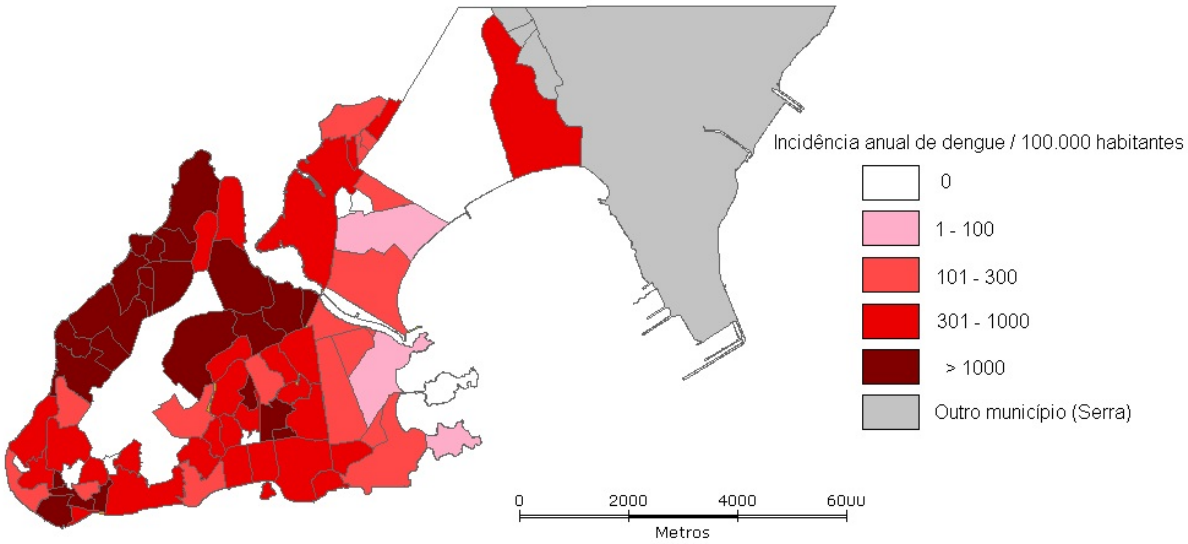

Figura 7: Incidência anual de dengue por 100.000 habitantes em cada bairro de Vitória, em 2011.

Para se conhecer o padrão de infestação por *A. aegypti* nos bairros de Vitória, em 2011 foi calculado a média dos IMFA semanais de cada bairro. Para isso, o número de fêmeas de *A. aegypti* capturadas por semana, em cada bairro, foi dividido pelo número de inspeções nas armadilhas feitas no mesmo bairro, durante a dada semana. A média foi então calculada por meio do somatório dos IMFA semanais dividido por52 (número de semanas epidemiológicas em um ano). Por meio deste cálculo, pôde-se perceber que, em 2011, foram observados valores de IFMA considerados como

“satisfatório” ou “moderado” em apenas 20 bairros, enquanto 47 (60%) bairros apresentaram IMFA semanais médios considerados “alerta”. Os valores tidos como críticos foram observados em 12 bairros. Estes dados estão demonstrados na Figura 8.

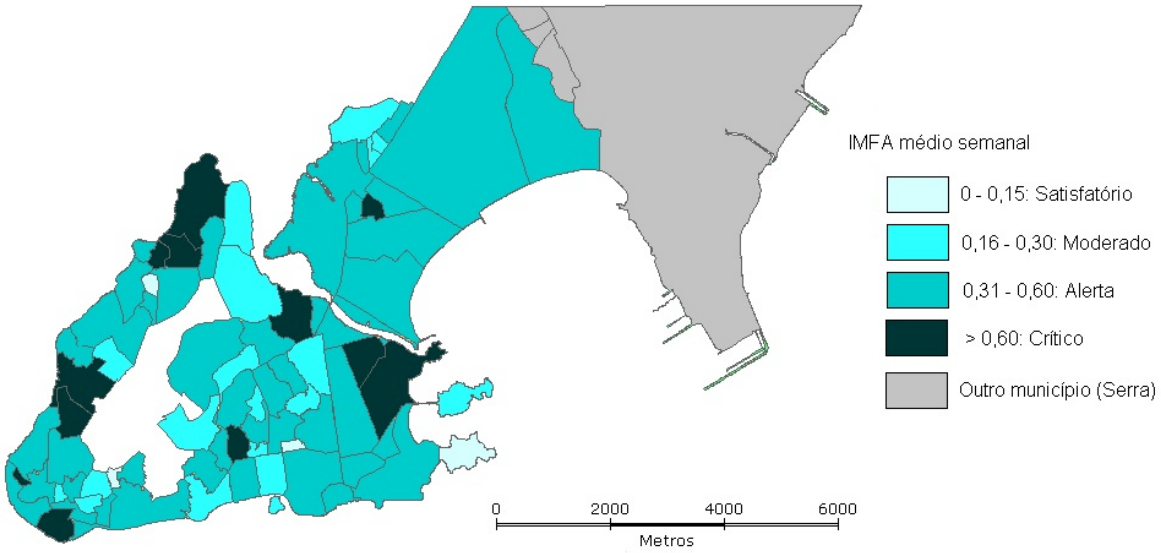

Figura 8: IMFA semanais médios distribuídos por bairro, em Vitória, 2011.

Por meio da Correlação de Pearson, não foi encontrada relação entre o IMFA médio semanal de cada bairro e a incidência anual de dengue no bairro (p= 0.848, Figura 9).

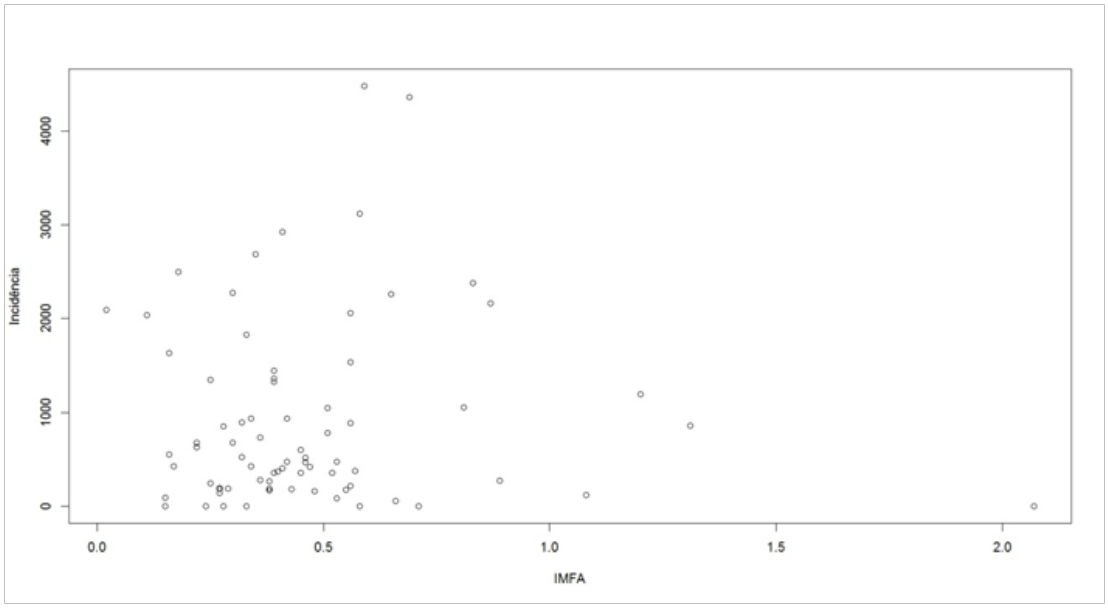

Figura 9: Gráfico de dispersão entre incidência anual de dengue nos bairros e IMFA.

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE *A. aegypti* INFECTADOS POR DENV E INCIDÊNCIA DA DOENÇA

Para se conhecer a localização das armadilhas as quais possuíam *A. aegypti* infectados pelo DENV, o endereço dos lotes positivos foram geoprocessados. Este geoprocessamento encontra-se demonstrado na Figura 10.

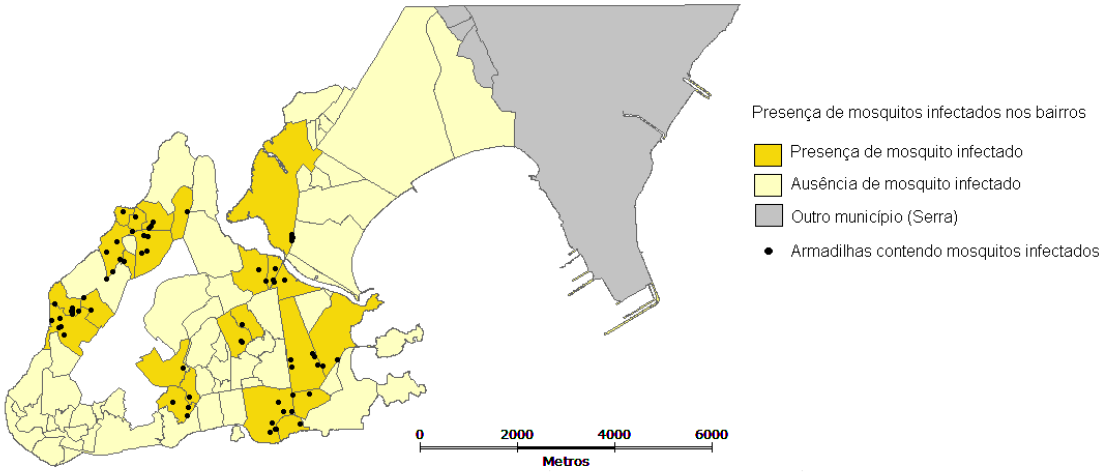

Figura 10: Distribuição das armadilhas contendo *A. aegypti* infectados pelo DENV em Vitória. Em amarelo, bairros nos quais foi detectada a presença de mosquitos infectados. Em bege, bairros nos quais a presença de mosquitos infectados não foi observada.

Devido ao fato de as análises de infecção dos mosquitos terem se iniciado somente em maio de 2011 e, a positividade de lotes ter sido detectada no período compreendido entre maio e agosto, a correlação entre presença de mosquitos infectados no bairro e incidência de dengue foi analisada utilizando-se apenas a incidência contabilizada neste período. Para isso, os bairros foram divididos em 2 grupos: bairros com a presença de *A. aegypti* infectados e bairro sem *A. aegypti* infectados. Para a comparação entre os dois grupos, foi aplicado o Teste T de Médias, o qual rejeitou a hipótese de igualdade das médias, ou seja, bairros com presença de mosquito infectado possuem maior média de incidência de dengue que bairros aonde não foi detectada a presença de vetores infectados (p=0.009). Deve-se ressaltar que o bairro Jardim Camburi foi excluído da confecção do gráfico por se tratar de um dado extremo.

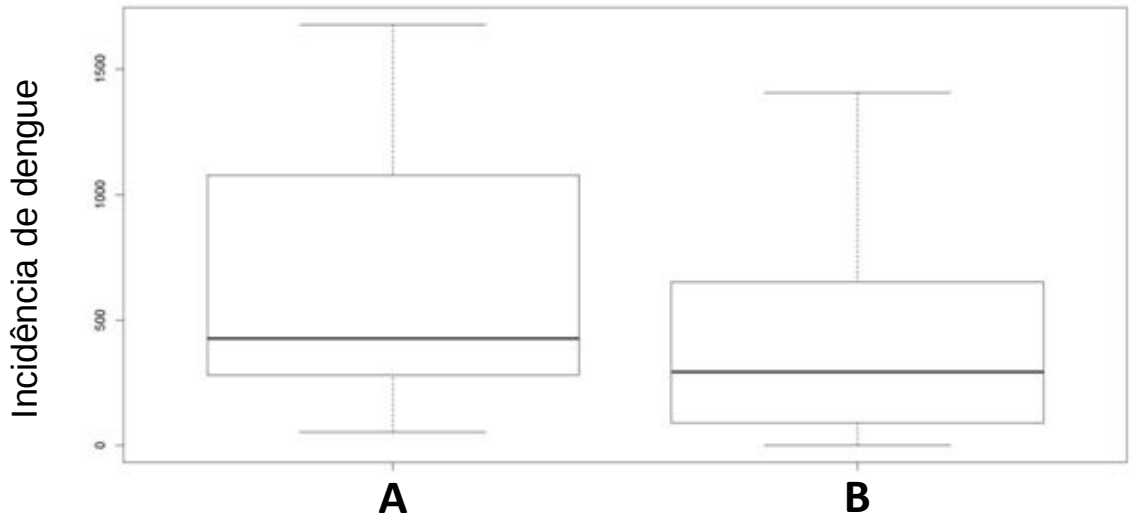

Figura 11: Média de incidência de dengue em bairros com e sem a presença de *A. aegypti* infectados. Em (A), bairros aonde foi observada a presença de mosquitos infectados. Em (B), bairros nos quais não foi detectada a presença de vetores infectados. O bairro Jardim Camburi foi excluído da análise por ser um dado extremo.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS CIRCULANTES

4.3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS EM AMOSTRAS HUMANAS

Para se conhecer os sorotipos do DENV circulantes em Vitória, foi feita uma amostragem de soros humanos previamente triados por NS1, os quais foram

submetidos à técnica de RT-PCR. Estes soros foram coletados nos meses de maio e junho de 2011. Das 261 amostras de soro humano analisadas, 204 (78,16%) foram positivas para o vírus DENV. Dentre as amostras positivas, 96,65% correspondiam ao sorotipo DENV-1, enquanto 2,94% foram positivas para o DENV-2. O DENV-3 foi encontrado em apenas uma amostra e não foi detectado nenhum caso de infecção por DENV-4. Estes resultados encontram-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 4: Sorotipos de DENV encontrados em amostras humanas.

Sorotipo	Número de amostras
DENV – 1	197 / 204 (96,56%)
DENV – 2	6 / 204 (2,94%)
DENV – 3	1 / 204 (0,50%)
DENV – 4	0 / 204 (0%)

A Figura 12 corresponde a um gel de agarose 2% feito para a detecção dos fragmentos amplificados na Semi – Nested PCR:

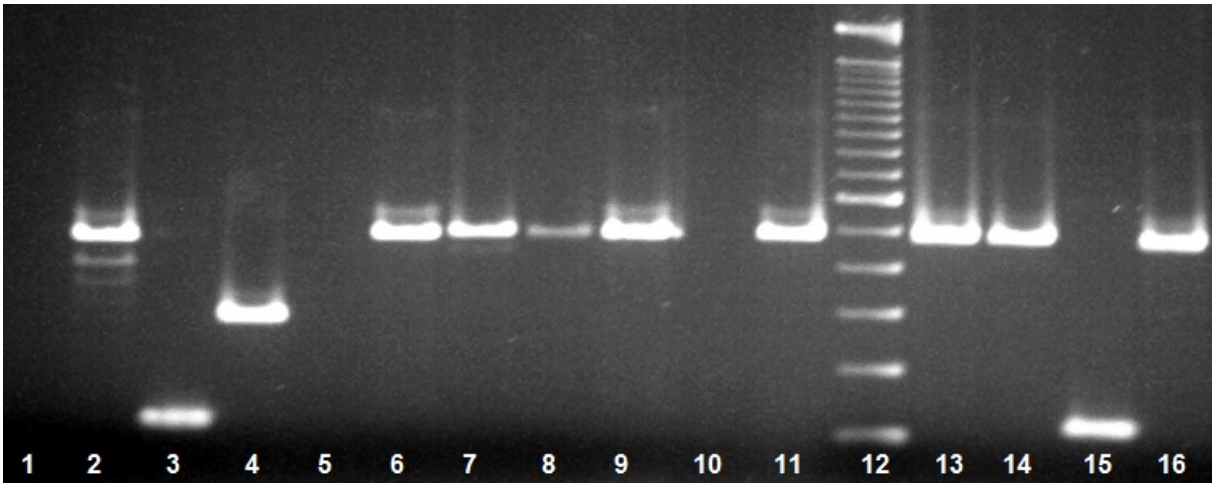

Figura 12: Gel de agarose da etapa de Semi – Nested PCR. Coluna 1: Controle negativo; Coluna 2: Controle positivo DENV-1; Coluna 3: Controle positivo DENV – 2; Coluna 4: Controle positivo DENV – 3; Coluna 5: Branco; Colunas 6 a 11: Amostras de pacientes; Coluna 12: Padrão de peso molecular; Colunas 13 a 16: Amostras de pacientes.

4.3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS EM AMOSTRAS DE *A. aegypti*

A análise da infecção dos vetores pelo DENV foi realizada entre maio e dezembro de 2011. Durante este período, foram analisados 1592 lotes de mosquitos capturados nas armadilhas distribuídas por Vitória. Destes, 17 lotes foram positivos para o DENV. O sorotipo DENV-1 foi encontrado em 82, 35% dos lotes positivos, enquanto o sorotipo DENV-2 foi encontrado em 17,65%. Os sorotipos 3 e 4 não foram detectados nos lotes analisados. A positividade do vírus nos mosquitos foi detectada entre os meses de maio a agosto. A partir da semana 33 (14/08/2011), todos os lotes analisados tiveram resultado negativo para DENV.

Tabela 5: Sorotipos de DENV encontrados em lotes de *A. aegypti*.

Sorotipo	Número de lotes de *A. aegypti*
DENV – 1	14 / 17 (82,35%)
DENV – 2	3 / 17 (17,65%)
DENV – 3	0 / 17 (0%)
DENV – 4	0 / 17 (0%)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Na epidemia de dengue ocorrida em Vitória, em 2011, dos 2.333 casos analisados, 90,74% foram classificados como dengue clássica, enquanto 6,60% foram classificados como dengue com complicações e 2,66% como febre hemorrágica da dengue, ou seja, a forma mais grave da doença. Agrupando os casos de dengue com complicações e febre hemorrágica da dengue, observa-se que a 9,26% da amostra analisada apresentou dengue grave. De acordo com o Ministério da Saúde, foi observada uma tendência de aumento no número de casos graves de dengue no Brasil durante a década de 2000, e essa tendência foi acompanhada com o aumento no número de internações por dengue no país. Em 2010, a taxa de hospitalização por dengue, no país, era em torno de 10% (MS, 2010). Na amostra analisada, foi observada uma ocorrência de hospitalização em 8,23% dos indivíduos acometidos por dengue. Porém, como em 15,15% das notificações esta informação foi ignorada, não se pode afirmar a taxa exata de internação na amostra estudada.

Foram observados, no estudo, dois casos de óbito por dengue em Vitória, no ano de 2011. No Brasil, o número de óbitos por dengue tem mostrado um aumento crescente. Na década de 90, por exemplo, o ano no qual houve o maior número de óbitos por dengue foi o ano de 1999, com 42 mortes contabilizadas. Já nos anos 2000, esses números chegaram a 656 em 2010, e 482 em 2011 e, desde 2002, os óbitos por dengue superam os óbitos por malária no país (MS, 2010). Estes dois casos de óbito na amostra analisada ocorreram em mulheres adultas (43 e 56 anos), que tiveram seu quadro clínico classificado como “dengue com complicações”. De acordo com Moraes e colaboradores (2013), idade acima de 50 anos, baixa escolaridade, ocorrência de hospitalização, aumento dos níveis de hematócrito e residir em zonas rurais são fatores que estão independentemente associados com óbitos por dengue. Apesar de a mortalidade por dengue estar associada com quadros hemorrágicos e choque, as duas mortes observadas não foram decorrentes de febre hemorrágica da dengue ou da síndrome do choque da dengue. Sabe-se que a mortalidade em indivíduos não classificados como dengue hemorrágica ou como síndrome do choque da dengue pode ser devida tanto à apresentação de manifestações não usuais quanto à presença de comorbidades. De acordo com Figueiredo (2012), nos últimos anos, as epidemias

de dengue em território nacional incluíram vários casos atípicos, nos quais houve manifestações como miocardite, hepatite, meningoencefalite, entre outras, o que pode explicar o fato de 6,60% de a amostra analisada ter sido classificada como dengue com complicações.

Foi também observado que uma grande proporção do número de casos de dengue confirmados em 2011 em Vitória, ES, ocorreu entre pessoas com idade igual ou superior a 18 anos (64,18%). Este dado corrobora os dados de outros estudos brasileiros, os quais demonstram que a maioria dos casos de dengue reportados ocorre principalmente entre adultos jovens (Siqueira – Junior *et al.,* 2005, Flauzino *et al.*, 2009; Cardoso *et al.* 2011;). De acordo com Halstead (2006), as epidemias de dengue nas Américas são caracterizadas por uma alta incidência de casos na população adulta, e este é um padrão distinto do que é observado no sudeste asiático, onde tanto formas clássicas quanto formas mais graves ocorrem majoritariamente em crianças. Apesar da maior incidência na população adulta, alguns trabalhos demonstram que, nos últimos anos, no Brasil, formas mais graves da doença têm acometido principalmente crianças (Teixeira *et al.*, 2008; Siqueira – Junior *et al.*, 2004, Figueiredo, 2012).

No que diz respeito ao sexo, foi detectada uma ligeira predominância do sexo feminino (54,27%) na amostra analisada. A maior ocorrência de dengue entre as mulheres já foi demonstrada em outros trabalhos realizados em algumas cidades brasileiras (Alves *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2011; Martelli *et al.*, 2011; Montenegro *et al.*, 2006). Um maior número de casos de dengue ocorrendo entre mulheres, no presente estudo, pode ser explicado por diversos fatores: dentre eles, pode-se citar o fato de, em Vitória, haver uma maior proporção de indivíduos do sexo feminino que de indivíduos do sexo masculino (53,04% e 46,96%, respectivamente, IBGE, 2012). Além disso, outras duas hipóteses que poderiam ser levantadas são o fato de as mulheres procurarem mais os serviços de saúde que os homens, o que levaria a uma maior freqüência de notificações por dengue entre elas, e o fato de as mulheres permanecerem mais tempo em ambientes residenciais, locais tidos como principais habitats do *A. aegypti,* tornando-as, assim, mais expostas à doença (Cardoso *et al.*, 2011).

No presente estudo, a cor de pele mais freqüentemente observada nos indivíduos avaliados foi “parda”, seguida da cor “branca”, e estas são as cores de pele mais prevalentes na população residente na capital capixaba. De acordo com o Censo 2010, 47,39% da população residente em Vitória se consideram “branca” e 42,33% se considera “parda” (IBGE, 2012).

Com relação ao número de casos de dengue detectados ao longo do ano, observou-se que o período no qual houve um maior número de casos da doença foi entre os meses de janeiro a julho, atingindo um pico no mês de maio. De fato, Câmara e colaboradores (2007) descreveram que, durante os anos de 1986 e 2003, em todas as cinco regiões brasileiras, a maior taxa de notificações por dengue ocorreu no primeiro semestre do ano. Segundo os mesmos autores, nos meses em que a temperatura cai, na segunda metade do ano, a incidência de casos da doença diminui significativamente. Contudo, isto não concorre para interromper a transmissão. Corroborando este achado, estudos mais recentes, realizados em diferentes cidades brasileiras, também descreveram um maior número de casos no primeiro semestre (Pessanha *et al.*, 2012; Eiras & Rezende, 2009; Sousa, 2012).

Em relação à densidade de vetores, é importante destacar que os maiores valores encontrados foram nos meses de janeiro, fevereiro e abril, ou seja, os maiores índices vetoriais precederam o pico de casos de dengue em aproximadamente quatro semanas. Esta relação temporal foi também demonstrada em trabalhos anteriores. No estudo de Barbosa & Lourenço (2010), por exemplo, foi observado que em 2006 e em 2007, o pico da epidemia de dengue da cidade de Tupã (SP) ocorreu dois meses após o pico dos índices larvários. Já Melo e colaboradores (2012), ao avaliarem três diferentes metodologias de pesquisa de vetores, reportaram que maiores densidades de ovos de *A. aegypti* ocorreram há mais de 200 dias antes do aparecimento de *clusters* de dengue, enquanto maiores densidades de formas adultas precederam os casos de dengue em aproximadamente 80 dias, sugerindo que a pesquisa de formas adultas de *A. aegypti* seja a uma forma mais precisa de se prever o aparecimento de casos. Entretanto, Honório e colaboradores (2009), não observaram relação temporal entre os índices entomológicos e o número de casos de dengue, quando avaliadas três diferentes regiões da cidade do Rio de Janeiro. Da mesma forma, Mendez e colaboradores (2006), não observaram relação entre aumento de índices

entomológicos e aumento da incidência da doença. Por outro lado, estes mesmos autores demonstraram que aumento nas taxas de infecção de mosquitos estava associado com aumento nas taxas de infecção de humanos no trimestre seguinte.

Apesar de, neste trabalho, não ter sido aplicado um método estatístico para se avaliar a relação entre condições climáticas e densidade de vetores, nota-se que o período no qual houve maiores capturas de fêmeas adultas de *A. aegypti* foi o período mais quente e chuvoso de 2011. A influência dos fatores climáticos na biologia do *A. aegypti* tem sido investigada em diferentes estudos. Schoof (1967), por exemplo, defende a hipótese de que altas umidades aumentam a longevidade dos *A. aegypti*. Ribeiro e colaboradores (2006) reportaram que a pluviosidade não só aumenta consideravelmente a quantidade de criadouros disponíveis para o desenvolvimento das formas imaturas do vetor, mas também gera condições ambientais mais apropriadas para o desenvolvimento de adultos.

Além da influência do clima na proliferação e desenvolvimento dos vetores, Thu e colaboradores (1998), demonstraram que as condições climáticas influenciam também a infecção dos mosquitos pelo DENV. Segundo estes autores, as temperaturas e umidades relativas de estações chuvosas favorecem a multiplicação viral nos mosquitos. Somando-se a isso, Focks & Chadee (1997) relataram que, em temperaturas mais altas, fêmeas infectadas teriam mais chance de completar o período de incubação extrínseco. De fato, em nosso estudo foi observado que, maiores densidades de formas adultas do vetor foram encontradas nos períodos quentes e chuvosos, sendo sucedidas por um aumento no número de casos. Segundo Halstead (2008), temperaturas mais altas, em conjunto com altas taxas de umidade relativa, aumentam a freqüência de repasto sanguíneo por parte das fêmeas, aumentando assim a probabilidade de transmissão de dengue. Entretanto, como em 2011 o monitoramento da infecção dos mosquitos na cidade de Vitória iniciou-se em maio, no presente estudo não foi possível investigara relação entre a presença de mosquitos infectados e condições climáticas.

Ao se realizar o geoprocessamento do número de casos de dengue da incidência de dengue por bairro, foi observado que, a maioria dos bairros com alta incidência da doença encontravam-se em regiões com menor poder socioeconômico e, dentre os

bairros com baixa incidência de dengue, muitos estão localizados em regiões mais nobres da cidade. Estudos realizados em diferentes cidades do Brasil têm reportado a associação entre ocorrência de dengue e piores condições socioeconômicas. Braga e colaboradores (2010) demonstraram que, em Recife, as taxas de soroprevalência da doença foram inversamente proporcionais às condições econômicas de cada região estudada. Os autores sugerem que esta diferença possa ser devida a maior proporção de apartamentos nas áreas mais nobres, visto que residir em casa, e não em apartamentos, foi considerado um fator de risco para se contrair a doença. Essa maior ocorrência de dengue em regiões mais pobres também já foi observada em outros estudos, como o de Caiaffa e colaboradores (2005), em Belo Horizonte e o de Siqueira – Junior (2001), em Goiânia. Em outros trabalhos, no entanto, essa associação não foi encontrada (Machado *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2002; Teixeira & Cruz, 2011). Porém, é importante ressaltar que, como nosso estudo baseou-se na incidência de casos de dengue confirmados pelo laboratório da Prefeitura Municipal de Vitória, a incidência da doença nos bairros mais economicamente privilegiados pode ter sido subestimada, provavelmente devido ao fato da maioria dos moradores destes locais não fazerem uso do serviço público de saúde.

Embora, neste estudo, tenha sido encontrada correlação temporal entre densidade de vetores e a ocorrência de casos de dengue, o mesmo não foi observado quando foi avaliada a correlação espacial. De fato, a não relação espacial entre a densidade de vetores e uma maior ocorrência de dengue já havia sido descrita em outros trabalhos, como o de Barbosa & Lourenço (2009) e o de Honório e colaboradores (2009). Neste último estudo, os autores demonstram a ocorrência de casos de dengue em residências localizadas em áreas com baixa densidade de mosquito. Diante deste fato, os autores defendem que, provavelmente, a infecção é contraída em outros locais que não as residências. Porém, os mesmos autores reforçam que a falta de associação entre presença de vetores e casos de dengue deve ser mais bem avaliada, levando em consideração não somente a densidade de mosquitos, mas também a presença de mosquitos infectados nos locais. A despeito destes fatos, Pessanha e colaboradores (2012), encontraram associação significativa entre quantidade média de ovos e índices larvários e incidência de dengue, do ano seguinte,em diferentes distritos sanitários de Belo Horizonte.

Apesar da associação espacial entre densidade de vetores e incidência de dengue não ter sido observada, houve uma relação significativa entre a incidência da doença e a presença de *A. aegypti* infectados pelo DENV, ou seja, bairros com presença de mosquito infectado têm maior incidência de casos de dengue. A relação espacial entre vetores infectados e indivíduos com dengue foi reportada por Yoon e colaboradores (2012). Neste estudo, foi demonstrado que as taxas de *A. aegypti* infectados por DENV eram significativamente maiores em locais com *clusters* de crianças portadoras de dengue que em locais com *clusters* de crianças sem a doença.

Além de analisar a relação espacial e temporal entre casos de dengue e densidade de vetores, neste estudo foi também realizada a identificação dos sorotipos circulantes, tanto em humanos quanto em *A. aegypti*. Os resultados mostraram que, em 2011, o sorotipo mais prevalente em Vitória, foi DENV-1 (encontrado em 82,35% dos lotes positivos de *A. aegypti* e em 96,56% das amostras humanas positivas para DENV). Este dado corrobora os dados do Ministério da Saúde, os quais demonstram que o DENV-1 foi o sorotipo de DENV mais encontrado em todas as cinco regiões do Brasil de janeiro a junho de 2011. Na região sudeste, este sorotipo foi detectado em 89,8% das amostras humanas positivas analisadas (MS, 2011).

A transmissão de dengue no Brasil vem apresentando um padrão marcado por ciclos de predomínio de um determinado sorotipo do vírus. Na década de 2000, cada ciclo foi caracterizado por novos períodos de alta transmissão da doença após cada mudança no sorotipo circulante. Além da ocorrência de epidemias de grande magnitude, a alternância de sorotipos predominantes tem levado a importantes alterações na epidemiologia da doença (MS, 2010). No presente estudo, os sorotipos encontrados em amostras de *A. aegypti* foram os mesmos encontrados em amostras humanas (DENV-1 e DEN-2), com exceção de um único caso humano no qual foi detectado o DENV-3, sorotipo o qual não foi detectado em nenhum lote de vetores, o que pode sugerir uma infecção adquirida em outro município do estado do ES, visto que o Ministério da Saúde reportou a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DEN-3 no Espírito Santo em 2011 (MS, 2011).

Apesar de o DENV-4 ter sido detectado no Brasil em 2010 (Temporão *et al.*, 2011)e, em 2011, sua presença ter sido reportada em diversos estados brasileiros (Nogueira&

Eppinghaus, 2011), sua entrada no Espírito Santo só ocorreu em 2012, não tendo sido, portanto, detectado nem em humanos e nem em lotes de *A. aegypti* no estudo em questão.

A concordância entre os sorotipos encontrados em humanos e em vetores já foi observada em outros trabalhos, como o realizado por Garcia – Rejon e colaboradores (2008) em Merida, México e o realizado por Guedes e colaboradores (2010) em Recife, Pernambuco. Neste último, foi observada a presença dos mesmos três sorotipos em vetores e em humanos em 2005. Entretanto, em 2006, havia três sorotipos em circulação nos vetores, mas apenas dois sorotipos foram detectados em amostras humanas. No trabalho de Urdaneta e colaboradores (2004), o principal sorotipo responsável pela epidemia de dengue em Maracay, Venezuela, em 2001, foi o DENV-3. Este mesmo sorotipo foi detectado em 84,6% dos lotes positivos de *A. aegypti* coletados na vizinhança onde residia pacientes com dengue. Já Yoon e colaboradores (2012) reportaram uma similaridade entre o sorotipo de DENV encontrado em crianças com dengue e o sorotipo do vírus encontrado em amostras de *A. aegypti* coletadas nas casas das mesmas crianças.

Em resumo, o presente estudo destaca a importância da vigilância entomológica constate para a predição de possíveis epidemias de dengue. Além disso, este estudo demonstra também que, tão importante quanto monitorar a densidade de vetores, é investigar a presença de vetores infectados nas cidades. Por fim, é importante ressaltar que estudos que combinam dados entomológicos e epidemiológicos são indispensáveis para um melhor entendimento da dengue.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Por meio do presente estudo, foi possível concluir que:

- A epidemia de dengue ocorrida em Vitória, em 2011, atingiu principalmente indivíduos acima de 18 anos e houve uma ligeira predominância de mulheres na amostra analisada;

- No período estudado, aproximadamente 10% dos casos foram classificados como formas mais graves de dengue e foram contabilizados dois óbitos;

- Durante todo o ano de 2011 a cidade de Vitória possuía índices médios de fêmeas de *A. aegypti* acima dos considerados satisfatórios;

- O aumento da densidade de vetores ocorreu em períodos de maior temperatura e pluviosidade e precedia em quatros semanas o aumento do número de casos;

- Não houve relação espacial entre casos de dengue e densidade de vetores;

- Bairros onde foram encontrados *A. aegypti* infectados possuíam maior incidência de dengue;

- O sorotipo circulante em Vitória, em 2011, foi predominantemente o DENV-1, tanto em humanos quanto em mosquitos, seguido pelo DENV-2 encontrado em menor proporção.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ALVES, J. A. B., SANTOS, J. R., MENDONÇA, E. N., ABUD, A. C. F., NUNES, M. S., FAKHOURI, R., INAGAKI, A. D. M., MARCHIORO, M., ANTONIOLLI, A. R. Epidemiological Aspects of Dengue in Aracaju, State of Sergipe, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6., p. 670 – 673, Nov – Dez. 2011.

BALMASEDA, A., HAMMOND, S. N., PÉREZ, L., TELLEZ, Y., SABORÍO, S. I., MERCADO, J. C., CUANDRA, R., CUANDRA, R., ROCHA, J., PÉREZ, S. S., ROCHA, C., HARRIS, E. Serotype-specific Differences in Clinical Manifestations of Dengue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 3, p.449–56. 2006.

BARBOSA, G. L. & LOURENÇO, R. W. Análise da Distribuição Espaço - Temporal de Dengue e da Infestação Larvária no Município de Tupã, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 43, n. 2, Mar - Abr, p.145–151. 2010.

BARRETO, M. L. & TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil : Situação Epidemiológica e Contribuições Para Uma Agenda de Pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n.64, Dec, p.53–72. 2008.

BRAGA, C., LUNA, C. F., MARTELLI, C. M. T., SOUZA, W. V., CORDEIRO, M. T., ALEXANDER, N., ALBUQUERQUE, M. F. P. M., SIQUEIRA - JR., J. C., MARQUES, E. T. Seroprevalence and Risk Factors For Dengue Infection in Socio - Economically Distinct Areas of Recife, Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, p. 234 - 240. 2010.

BRAGA, I. A. & VALLE, D. *Aedes aegypti*: Histórico do Controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, Abr - Jun, p.113–118. 2007.

BOOM, R., SOL, C. J., SALIMANS, M. M., JANSENS, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, VAN DER NOORDAA, J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495 - 503, Mar, 1990.

CÂMARA, F. P., THEOPHILO, R. L. G., SANTOS, G. T., PEREIRA, S. R. F. G., CÂMARA, D. C. P., MATOS, R. R. C. Estudo Retrospectivo (Histórico) da Dengue no Brasil : Características Regionais e Dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, Mar - Abr, p.192–196. 2007.

CAIAFFA, W. T., ALMEIDA, M. C. M., OLIVEIRA, C. L., FRICHE, A. A. L., GESTEIRA E MATOS, S., DIAS, M. A. S., CUNHA, M. C. M., PESSANHA, E., PROIETTI, F. A. The Urban Environment from the Health Perspective: The Case of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, Mai - Jun, p. 958 - 967. 2005.

CARDOSO, I. M. Epidemiologia da Dengue em Vitória, ES, 1995 - 2009. 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal do Espírito Santo. 2010.

CARDOSO, I. M., CABIDELLE, A. S. A., BORGES, P. C. L., LANG, C. F., CALENTI, F. G., NOGUEIRA, L. O., FALQUETO, A., CERUTTI - JUNIOR, C. **Dengue: Clinical Forms and Risk Groups in a High Incidence City in the Southeast Region of Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, n. 4, p. 430 - 435, Jul - Ago. 2011.

CHAN, K. S., CHANG, J. S., CHANG, K., LINS, C. C., HUANGS, J. H., LIN, W. R., CHEN, T. C., HSIEH, H. C., LIN, S. H., LIN, J. C., LU, P. L., CHEN, Y. H., LIN, C. Y., TSAI, J. J. Effect of Serotypes on Clinical Manifestations of Dengue Fever in Adults. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection***,* v. 42, n. 6, Ago, p.471- 8. 2009.

CONSOLI, R.A.G.B. & LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1 ed. 1994.

CORDEIRO, M. T., SILVA, A. M., BRITO, C. A. A., NASCIMENTO, E. J. M., MAGALHÃES, M. C. F., GUIMARÃES, G. F., LUCENA - SILVA, N., CARVALHO, E. M. F., MARQUES JR, E. T. A. Characterization of a Dengue Patient Cohort in Recife, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, Set, p.1128 - 34. 2007.

CORDEIRO, R., DONALISIO, M. R., ANDRADE, V. R., MAFRA, A. C. N., NUCCI, L. B., BROWN, J. C., STEPHAN, C. Spatial Distribution of the Risk of Dengue Fever in Southeast Brazil, 2006-2007. **BMC Public Health**, v. 11, n. 1, Mai, p. 2 - 10. 2011.

COX, F. E. G. Ilustrated History of Tropical Diseases, p. 149 - 153, The Wellcome Trust, Londres. 1996.

DAVID, M. R., LOURENÇO - DE - OLIVEIRA, R. & FREITAS, R.M.D. Container Productivity, Daily Survival Rates and Dispersal of *Aedes aegypti* Mosquitoes in a High Income Dengue Epidemic Neighbourhood of Rio de Janeiro: Presumed Influence of Differential Urban Structure on Mosquito Biology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, Set, p.927– 32. 2009.

ECOVEC. Disponível em: <http://www.midengue.com.br/clientes/clientes.php>. Acesso em 17 de nov. 2012.

EIRAS, A. & RESENDE, M. C. Preliminary Evaluation of The “Dengue-MI” Technology for *Aedes aegypti* Monitoring and Control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p.45–58. 2009.

EISEN, L. & LOZANO - FUENTES, S. Use of Mapping and Spatial and Space-Time Modeling Approaches in Operational Control of *Aedes aegypti* and Dengue. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 4, Abr, p. 1 - 7. 2009.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3: 285, Mai - Jun, 2012.

FLAUZINO, R. F., SOUZA - SANTOS, R., BARCELLOS, C., GRACIE, R., MAGALHÃES, M. A. F. M., OLIVEIRA, R. M. Spatial heterogeneity of dengue fever in local studies, City of Niterói, Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, n. 43, v. 6, p.1035 - 43. 2009.

FOCKS, D. A. A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). World Health Organization, 2003.

FOCKS, D. A. & CHADEE. D. D. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for Aedes aegypti: an example using data from Trinidad. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 2, p. 156 - 167. 1997.

FRIED, J. R., GIBBONS, R. V., KALAYANAROOJ, S., THOMAS, S. J., SRIKIATKHACHORN, A., YOON, I. K., JARMAN, R. G., GREEN, S. ROTHMAN, A. L., CUMMINGS, D. A. T. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, Mar, p.e617. 2010.

FUNASA (BRASIL). Resumo entomológico anual de dengue e febre amarela 1999. Vitória (ES): Fundação Nacional de Saúde, Coordenação do Espírito Santo. 1999.

GARCIA - REJON, J., LOROÑO - PINO, M. A., FARFAN - ALE, J. A., FLORES - FLORES, L., ROSADO - PAREDES, E. D. P., RIVERO - CARDENAS, N., NAJERA - VAZQUES, R., GOMEZ - CARRO, S., LIRA - ZUMBARDO, V., GONZALEZ - MARTINEZ, P., LOZANO - FUENTES, S., ELIZONDO -QUIROGA, D., BEATY, B. J., EISEN, L. Dengue virus-infected Aedes aegypti in the home environment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p.940 - 50. 2008.

GOMES, A. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia)aegypti* e *Aedes(Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. **Inf Epidemiol SUS**, v. 7, n. 3., Jul - Set, p. 49 - 7. 1998.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n. 3, p.480 - 96. 1998.

GUEDES, D. R. D., CORDEIRO, M. T., MELO - SANTOS, M. A. V., MAGALHÃES, T., MARQUES, E., REGIS, L., FURTADO, A. F., AYRES, C. F. J. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 2, Jun, p.67 - 75. 2010.

GUZMÁN, M. G., KOURÍ, G., BRAVO, J., VALDES, L., VAZQUES, S., HALSTEADT, S. B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 118 -124. 2002.

GUZMÁN, M. G. & KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p.69 - 80. 2004.

HALSTEAD, S. B. & O'ROURKE, E. J., Dengue Viruses and Mononuclear Phagocytes - I. Infection Enhancement by Non-Neutralizing Antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n.1, p.201 - 17. 1977.

HALSTEAD, S.B. Dengue in The Americas and Southeast Asia: do they differ? **Pan American Journal of Public Health**, v. 6, n. 20, p. 407 - 415. 2006.

HALSTEAD, S. B. Dengue Virus - Mosquito Interactions. Annual Review of Entomology, v. 53, Set, p. 273 - 291. 2008.

HAMMON, W., RUDNICK, A. & SATHER, G. E. Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. **Science**,v. 131, n. 3407, p.1102 - 3. 1960.

HONÓRIO, N. A., NOGUEIRA, R. M. R., CODEÇO, C. T., CARVALHO, M. S., CRUZ, O. C., MAGALHÃES, M. A. F. M., ARAÚJO, J. M. G., ARAÚJO, E. S. M., GOMES, M. Q., PINHEIRO, L. S., PINEL, C. S., LOURENÇO - DE - OLIVEIRA, R. Spatial Evaluation and Modeling of Dengue Seroprevalence and Vector Density in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, Nov, p.e545. 2009.

IBGE. Censo demográfico 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasil. Acesso em 27 de out, 2012.

KIMURA, R., HOTTA, S. Studies on dengue fever (VI). On the inoculation of dengue virus to mice. **Nippon Igaku**(3380): 629-633. 1944.

KUHN, R. J., ZHANG, W., ROSSMANN, M. G., PLETNEV, S. V., CORVER, J., LENCHES, E., JONES, C. T., MUKHOPADHYAY, S., CHIPMAN, P. R., STRAUSS, E. G., BAKER, T. S., STRAUSS, J. H. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, Mar, p.717–25. 2002.

LAMBRECHTS, L., SCOTT, T. W. & GUBLER, D. J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, Maio, p. e646. 2010.

LANCIOTTI, R. S., CALISHER, C. H., GUBLER, D. J., CHANG, G. J., VORNDAM, V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, Mar, p.545 - 51. 1992.

LEUNG, A. Diseases of the Premodern Period in China. **The Cambrigde World History of Human Disease**. Cambridge University Press: Crambridge, UK, p. 354 - 361. 1993.

LOURENÇO - DE - OLIVEIRA, R., HONÓRIO, N. A., CASTRO, M. G., SCHATZMAYR, H. G., MIAGOSTOVICH, M. P., ALVES, J. C. R., SILVA, W. C., LEITE, P. J. NOGUEIRA, R. M. R. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, Set, p.799 - 800. 2002.

MACHADO, J. P., OLIVEIRA, R. M. & SOUZA - SANTOS, R. Análise Espacial da Ocorrência de Dengue e Condições de Vida na Cidade de Nova Iguaçu , Estado do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, Mai, p.1025 - 1034. 2009.

MAMMEN Jr., M. P., PIMGATE, C. KOENRAADT, J. M., ROTHMAN, A. L., ALDSTADT, A. N., JARMAN, R. G., JONES, J. W., SRIKIATKHACHORN, A., YPIL - BUTAC, C. A., GETIS, A., THAMMAPALO, S., MORRISON, A. C., LIBRATY, D. H., GREEN, S. SCOTT, T. W. Spatial and Temporal Clustering of Dengue Virus Transmission in Thai Villages. **Plos Medicine**, v.5, n. 11, Nov, p. 1605 - 1616. 2008.

MARTELLI, C. M. T., NASCIMENTO, N. E., SUAYA, J. A., SIQUEIRA - JR., J. B., SOUZA, W. V., TURCHI, M. D., GUILARDE, A. O., PERES - JR., J. B., SHEPARD, D. S. Quality of Life Among Adults with Confirmed Dengue in Brazil. **The American Journal of Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 732 - 738. 2011.

MARTINS, V. E. P., ALENCAR, C. H., KAMIMURA, M. T., ARAÚJO, F. M. C., DE SIMONE, S. G., DUTRA, R. F., GUEDES, M. I. F. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PloS One**, v. 7, n. 7, Jul, p. e41386. 2012.

MELO, D. P. O., SCHERRER, L. R. & Eiras, A. E. Dengue Fever Occurrence and Vector Detection by Larval Survey, Ovitrap and MosquiTRAP: a Space-Time Clusters Analysis. **PloS One**, v. 7, n. 7, Jul, p. 1 - 11. 2012.

MENDEZ, F., BARRETO, M., ARIAS, J. F., RENGIFO, G., MUÑOZ, J., BURBANO, M. E., PARRA, B. Human and Mosquito Infections by Dengue Viruses During and After Epidemics in a Dengue - Endemic Region of Colombia. The American Journal of Medicine and Hygiene, v. 74, n. 4, p. 678 - 683. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Dengue: Diagnóstico e Manejo Clínico - Adulto e Criança. Brasília, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Diretrizes Nacionais Para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Brasília, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Balanço Dengue - Janeiro a Junho 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/balanco_060711.pdf. Acesso em 21/02/2013.

MISTÉRIO DA SAÚDE (A) (BRASIL). Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_de_dengue_classica_brasil_1990_2011.pdf>. Acesso em 02 de out. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (B) (BRASIL). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetaleNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=12305>. Acesso em 15 de nov, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Dengue no Brasil: Tendências e Mudanças na Epidemiologia, com Ênfase nas Epidemias de 2008 a 2010. Saúde Brasil 2010: Uma Análise da Situação de Saúde e de Evidências Selecionadas de Impacto de Ações de Vigilância em Saúde. Brasília, 2010.

MORAES, G. H., DUARTE, E. D., DUARTE, E. C. Determinants of Mortality from Severe Dengue in Brazil: A Population - Based Case - Control Study.**The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2013.

MONTENEGRO, D., LACERDA, H. R., OLIVEIRA, D. S., LIMA, A. A., GUIMARÃES, M. J., VASCONCELLOS, P. G. Clinical and Epidemiological Aspects of the Dengue Epidemic in Recife, PE, 2002. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 1, p. 9 - 13. 2006.

NOGUEIRA, R. M. R. & EPPINGHAUS, A. L. F. Dengue Virus Type 4 Arrives in the State of Rio de Janeiro: A Challenge For Epidemiological Surveillance and Control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, Mai, p.255 - 6. 2011.

NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., FILIPPIS, A. M. B., PEREIRA, M. A. S., SCHATZMAYR, H. G. Dengue Virus Type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, Out, p.925 - 6. 2001.

NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., LAMPE, E., SCHATZMAYR, H. G. Isolation of Dengue Virus Type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, Jun, p. 253. 1990.

OCASIONEZ, R. E., GÓMEZ, S. Y. & CORTÉS, F. M. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. **Revista de Salud Pública**, n. 9, v. 2, Jun, p.262 - 274. 2007.

OSANAI, C. H., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A, TANG, A. T., AMARAL, R. S., PASSOS, A. D. C., TAUIL, P. L. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1., Jan - Fev, p. 53 - 4. 1983.

PEDRO, A. O dengue em Nitcheroy. **Brazil Médico**,v.1, n.13, p. 174 - 7. 1923.

PERERA, R. & KUHN, R. J. Strutural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, Ago, p.369 - 77. 2008.

PESSANHA, J. E. M., CAIAFFA, W. T., CECILIO, A. B., IANI, F. C. M., ARAUJO, S. C., NASCIMENTO, J. C., KROON, E. G., PROIETTI, F. A., ARIAS, J. R. Cocirculation of Two Dengue Virus Serotypes in Individual and Pooled Samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Larvae. **Revista da Sociedade brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, Jan - Fev, p.103–105. 2011.

PESSANHA, J. E. M. P., CAIAFFA, W. T., ALMEIDA, M. C. M., BRANDÃO, S. T., PROIETTI, F. A. Diffusion Pattern and Hotspot Detection of Dengue in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**. 2012.

PINHEIRO, V. C. S., TADEI, W. P., BARROS, P. M. S. S., VASCONCELOS, P. F. C., CRUZ, A. C. R. Detection of Dengue Virus Serotype 3 by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in *Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)* Captured in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.8, Dez, p.833 - 9. 2005.

RIBEIRO, A. F., MARQUES, G. R. A. M., VOLTOLINI, J. C., CONDINO, M. L. F. Associação Entre Incidência de Dengue e Variáveis Climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 4., p. 671 - 676. 2006.

RODHAIN, F. & ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. **Dengue and dengue-hemorrhagic fever**. New York: CAB International; p. 45-60.1997.

ROTHMAN, AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. **Advances in Virus Research**,v.60, p. 397 - 419. 2003.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**,v.1, n. 1, p. 30 – 50. 1952.

SCHOOF, H. F. Mating, Resting Habits and Dispersal of *Aedes Aegypti*. **WHO Bulletin**, v. 36, p. 600 - 601. 1967.

SEIDAHMED, O. M., HASSAN, S. A., SOGHAIER, M. A., SIAM, H. A., AHMED, F. T., ELKARSANY, M. M., SULAIMAN, S. M. A. Spatial and Temporal Patterns of Dengue Transmission Along a Red Sea Coastline: A Longitudinal Entomological and Serological Survey in Port Sudan City. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, Set, p. 1 - 11. 2012.

SERGIO, A. D. M., FIGUEROA, E. G., SAADIA, V. G. M., ELIZABETH, S. H., BEATRIZ, R. S., VÍCTOR, M. A. A., ESPINOSA, J. N. Leptospirosis Prevalence in Patients with Initial Diagnosis of Dengue. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1 - 5. 2012.

SIERRA, B. de la C., KOURÍ, G. & GUZMÁN, M. G. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, v. 152, n. 3, Nov, p.533–42. 2007.

SIQUEIRA JR., J. B. Vigilância do Dengue: Aplicação dos Diagramas de Controle e Análise Espacial no Município de Goiânia - Goiás. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. 2001.

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

SOUSA, E. P. P. Influência das Variáveis Climáticas em Casos de Dengue nas Cidades da Baixada Santista (Sudeste do Brasil) e Cingapura (Sudeste Asiático). 2012. Tese (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2012.

TEIXEIRA, M. G., BARRETO, M. L., COSTA, M. C. N., FERREIRA, L. D. F., VASCONCELOS, P. F. C., CAIRNCROSS, S. Dynamics of Dengue Virus Circulation: A Silent Epidemic in a Complex Urban Area. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 9, Set, p. 757 - 762. 2002.

TEIXEIRA, M. G., COSTA, M. C. N., COELHO, G., BARRETO, M. L. Recent Shift in Age Pattern of Dengue Hemorrahgic Fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, Out, p. 1663. 2008.

TEIXEIRA, T. R., & CRUZ, O. G. Spatial Modeling of Dengue and Socio - environmental Indicators in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 3., p. 591 - 602. 2011.

TEMPORÃO, J. G., PENNA, G. O., CARMO, E. H., COELHO, G. E., AZEVEDO, R. S. S., NUNES, M. R. T., VASCONCELOS, P. F. C. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.5, Mai, p.938 - 9. 2011.

THAMMAPALO, A. C., ZIELINSKI - GUTIERRES, E., SCOTT, T. W., ROSENBERG, R. Relationship Between Transmission Intensity and Incidence Hemorrahagic Fever in Thailand. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, Jul, p. 1 - 13. 2008.

THAVARA, U., TAWATSIN, A., CHANSANG, C., KONG - NGAMSUK, W., PAOSRIWONG, S., BOON - LONG, J., RONGSRIYAM, Y., KOMALAMISRA, N. Larval Occurrence, Oviposition Behavior and Biting Activity of Potential Mosquito Vectors of Dengue on Samui Island, Thailand. **Journal of vector ecology : Journal of the Society for Vector Ecology**, v. 26, n. 2, Dez, p.172 - 80. 2001.

THOMAS, L., VERLAETEN, O., CABIÉ, A., KAIDOMAR, S., MORAVIE, V., MARTIAL, J., NAJIOULLAH, F., PLUMELLE, Y., FONTEAU, C., DUSSART, P., CÉSAIRE, R. Influence of the Dengue Serotype, Previous Dengue Infection, and Plasma Viral Load on Clinical Presentation and Outcome During a Dengue-2 and Dengue-4 Co-Epidemic. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p.990 - 8. 2008.

THU, H. M., AYE, K. M. & THEIN, S. The Effect of Temperature and Humidity on Dengue Virus Propagation in *Aedes Aegypti* Mosquitos. **TheSoutheast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 29, n. 2, Jun, p. 280 - 284. 1998.

URDANETA, L., HERRERA, F., PERNALETE, M., ZOGHBI, N., RUBIO - PALIS, Y., BARRIOS, R., RIVERO, J., COMACH, G., JIMÉNEZ, M., SALCEDO, M. Detection of Dengue Viruses in Field - Caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua State, Venezuela by Type - Specific Polymerase Chain Reaction. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, Nov, p. 177 - 184. 2005.

VAUGHN, D. W., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., INNIS, B. L., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S, ENDY, T. P., RAENGSAKULRACH, B., ROTHMAN, A. L., ENNIS, F. A., NISALAK, A. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, Dez, p.2 - 9. 2000.

WHO. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva, World Health Organization. 2009.

WHO. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>, World Health Organization. Acesso em 17 de nov. 2012.

YOON, I. K., GETIS, A. ALDSTADT, J., ROTHMAN, A. L., TANNISTISUPAWONG, D. KOENRAADT, C. J., FANSIRI, T., JONES, J. W., MORRISON, A. C., JARMAN, R. G., NASALAK, A., MAMMEN - JR., M. P., THAMMAPALO, S., SRIKIATKHACHORN, A., GREEN, S. LIBRATY, D. H., GIBBONS, R. V., ENDY, T., PIMGATE, C., SCOTT, T. W. Fine Scale Spatiotemporal Clustering of Dengue Virus Transmission in Children and *Aedes aegypti* in rural Thai Villages. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, Jul, p. 1 - 7. 2012.

ZEIDLER, J. D., ACOSTA, P. O. A., BARRÊTO, P. P., CORDEIRO, J. S. Dengue Virus in *Aedes aegypti* Larvae and Infestation Dynamics in Roraima, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n.6, p.986 - 91. 2008.