

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL  
MESTRADO ACADÊMICO

**JULIANA MARIA TRINDADE BEZERRA**

DENSIDADE POPULACIONAL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E  
TAXA DE INFECÇÃO POR VÍRUS DENGUE EM SÃO LUÍS, MARANHÃO

São Luís, 2010

**JULIANA MARIA TRINDADE BEZERRA**

DENSIDADE POPULACIONAL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E  
TAXA DE INFECÇÃO POR VÍRUS DENGUE EM SÃO LUÍS, MARANHÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Título de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

Orientadora: Dra. Valéria Cristina Soares  
Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

São Luís, 2010

Bezerra, Juliana Maria Trindade.

Densidade populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e taxa de infecção por vírus dengue em São Luís, Maranhão / Juliana Maria Trindade Bezerra. – São Luís, 2010.

97 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientadora: Valéria Cristina Soares Pinheiro.

Co-orientador: Wanderli Pedro Tadei.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, 2010.

1. *Aedes aegypti* – Variáveis climáticas – São Luís – MA. 2. Dengue. 3. Vírus. I. Título.

CDU 578.42 (812.1)

**JULIANA MARIA TRINDADE BEZERRA****DENSIDADE POPULACIONAL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E  
TAXA DE INFECÇÃO POR VÍRUS DENGUE EM SÃO LUÍS, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Título de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro (Orientadora)  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

---

Profa. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz  
Universidade Estadual do Pará – UEPA

---

Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

---

Profa. Dra. Emygdia Rosa do Rego Barros Pires Leal Mesquita  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

*Aos meus maiores incentivadores,  
meus pais José e Lucimar.*

## AGRADECIMENTOS

A realização desta pesquisa contou com a colaboração de amigos, colegas de laboratório e instituições, aos quais agradeço sinceramente.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil pelos conhecimentos adquiridos nesses dois anos de vivência como pós-graduanda.

À Coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, em especial à Doutora Luciane Maria Oliveira Brito e à secretária Helena Ribeiro.

À Fundação de Amparo ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da Bolsa de Mestrado.

À Professora Doutora Valéria Cristina Soares Pinheiro, pela oportunidade oferecida, pelo incentivo ao ingresso no mundo científico, pela confiança em mim depositada, por ser uma amiga, pela paciência, pelas correções e sugestões, pelos ensinamentos e por tudo que não consigo descrever em palavras.

Ao Professor Doutor Wanderli Pedro Tadei, que apesar da distância sempre esteve presente em todos os momentos desta pesquisa ao me orientar, pelo apoio financeiro, pelos bons momentos, pelas conversas de incentivo nos encontros científicos, e por ser um exemplo de profissional e pessoa a ser seguido.

À Professora Doutora Ana Cecília Ribeiro Cruz pelo precioso auxílio nas análises moleculares e por proporcionar meu estágio no Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua (PA). Por ser esta pessoa humilde que me acolheu com muito carinho e muito me ensinou sobre ciência e vida.

Aos profissionais dos Laboratórios de Entomologia, Cultura de Células e Biologia Molecular do IEC pela colaboração, ensinamentos e paciência durante meu período de estágio.

Ao Professor Doutor Jivanildo Pinheiro Miranda pela realização das análises estatísticas e pelas contribuições na escrita desta dissertação.

Ao amigo João Alberto Santos Porto, pela formatação dos bairros de coleta.

À Secretaria Municipal de Saúde, em especial a Pedro Souza Tavares, Verônica de Sousa Lopes, Raqueline de Jesus Barreto, pelo apoio material na cessão de transporte, e à disponibilização dos agentes de endemias e supervisores que me

acompanharam durante as coletas de alados e contribuíram grandemente para a realização desta pesquisa.

A todos do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Estudos Superiores de Caxias – Universidade Estadual do Maranhão (CESC-UEMA), em especial aos meus amigos Meiriany Araújo Lucena, Sebastiana Silva Ibiapina, Janaína Kelly Pinho Bezerra Silva, Joelma Soares da Silva, Francisco das Chagas Santana e Irene Alves da Silva Neres, por terem feito parte desta pesquisa, ao me auxiliarem nas coletas, pelo incentivo, e pelos momentos de descontração nestes anos de convivência.

Ao técnico em entomologia da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), Francisco Santos Leonardo, pelo auxílio nas coletas, pela atenção, ensinamentos e pela amizade que firmamos.

Aos moradores dos imóveis visitados por permitirem a entrada da equipe e a realização das coletas.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa por participarem da avaliação deste trabalho.

Aos amigos e colegas de turma do mestrado, pelos bons momentos vividos nesta etapa de nossas vidas e especialmente à Elda Pereira Noronha e à Heliana Trindade Marinho pela amizade, pelas caronas, pelos trabalhos e conversas jogadas fora.

De modo particular agradeço à amiga Lila Isabel Câmara de Paula e a toda sua família, pela atenção, carinho e amizade durante minha estada em São Luís, por sempre me auxiliar nos trabalhos de mestrado, pelos passeios, pelos conselhos e por ser alguém tão abençoada que tanto amo e um exemplo de vida.

À Zélia Xeres, que também foi como uma mãe, nesse período de estada na capital do Estado.

Ao casal Tomás e Antonia Melo, e à Bruna Melo por terem me acolhido durante quatro meses em seu lar.

Às pessoas mais importantes da minha vida. Ao meu pai José Rodrigues Bezerra Filho e a minha mãe Lucimar Trindade Bezerra que não mediram esforços físicos ou financeiros para a realização desta meta, por terem se transformado em biólogos por minha causa, por me ampararem, por me amarem. Agradeço pela vida.

Acima de tudo a Deus, pela vida, pela força, pela coragem, por me iluminar e me fazer acreditar que se lutar posso realizar um sonho.

*“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos,  
mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”.*

**Confúcio**

## RESUMO

Este estudo objetivou obter a densidade populacional de *Aedes aegypti* e identificar a presença de vírus dengue em formas aladas do vetor coletadas em diferentes períodos do ano no município de São Luís, Maranhão. Foram coletados mosquitos em três períodos: seco (novembro e dezembro de 2008), chuvoso (março e abril de 2009), e intermediário (julho e agosto de 2009). Foram visitados 320 imóveis em oito bairros previamente sorteados de dois distritos: Coréia de Baixo, Lira, Goiabal e João Paulo (Distrito Centro); e Itapiracó, Residencial Canudos, Conjunto Cohatrac I e Vila Luisão (Distrito Cohab). Utilizou-se aspirador mecânico ligado a bateria para captura dos alados. Após contagem, identificação e armazenamento, os espécimes foram encaminhados ao Instituto Evandro Chagas, em Ananindeua, Estado do Pará, para realização das análises viral e molecular por isolamento viral e Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). Também foram obtidos os dados climatológicos referentes ao período de estudo. Foram coletados 563 mosquitos *A. aegypti*, com predominância de alados no período chuvoso, não havendo diferença significativa na quantidade de espécimes por período. Também não foi observada correlação positiva e negativa entre os fatores abióticos e o número de alados. Em relação aos bairros, o João Paulo e o Goiabal obtiveram densidades estatisticamente significantes. Os exemplares de *A. aegypti* foram divididos em lotes, considerando-se os bairros de coleta, sendo formados 13 no período seco, 23 no chuvoso e 15 no intermediário. O isolamento viral e a RT-PCR das amostras não atestaram positividade para os vírus dengue. Esses resultados mostram que a densidade do *A. aegypti* aumentou no período chuvoso e os bairros João Paulo e Goiabal apresentaram a maior quantidade de exemplares, evidenciando que em São Luís, os fatores climáticos influenciam a flutuação sazonal do vetor.

Palavras-chave: *A. aegypti*. Variáveis climáticas. Dengue. Vírus.

## ABSTRACT

This study aimed to obtain *Aedes aegypti* density population and to identify the presence of dengue virus in adults vector collected at different periods of the year in São Luís, Maranhão. Mosquitoes were collected in three periods: dry (November and December 2008), rainy (March and April 2009) and intermediate (July and August 2009). Were visited 320 properties in eight neighborhoods previously drawn from two districts: “Coréia de Baixo”, “Lira”, “Goiabal” and “João Paulo” (“Distrito Centro”) and “Itapiracó”, “Residencial Canudos”, “Conjunto Cohatrac I” and “Vila Luisão” (“Distrito COHAB”). We used mechanical vacuum on the battery to catch *A. aegypti* adults. After counting, identification and storage, the specimens were sent to the “Instituto Evandro Chagas”, in Ananindeua, State of Pará, to carry out the molecular and viral analysis for virus isolation and Reverse Transcription followed by Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Also obtained climatological data for the period of study. We collected 563 mosquitoes *A. aegypti*, with predominance of adults in the rainy season, but not have significant difference in the amount of specimens of *A. aegypti* per period. There was also no positive and negative correlation between the factors and the number of *A. aegypti* adults. About the neighborhoods, “João Paulo” and “Goiabal” were obtained statistically significant densities. Specimens of *A. aegypti* were divided into pools, considering the neighborhoods of collection, with 13 formed in the dry season, 23 in the rainy season and 15 in the intermediate period. Viral isolation and RT-PCR of samples were not positive for the attested dengue virus. These results show that *A. aegypti* density increased during the rainy season and the “João Paulo” and “Goiabal” neighborhoods had the largest number of specimens, showing that in São Luís, the climatic factors may to influence the vector seasonal fluctuation.

Key Words: *A. aegypti*. Climatic variables. Dengue. Virus.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular do vírus dengue..... 26
- Figura 2.** Mapa dos bairros de realização das coletas, município de São Luís, Maranhão ..... 33
- Figura 3.** Aspirador mecânico acoplado à bateria, utilizado na captura de alados de *A. aegypti* ..... 38
- Figura 4.** Coleta de alados de *A. aegypti* no intradomicílio em imóvel do bairro Coréia de Baixo, São Luís, Maranhão..... 38
- Figura 5.** Coleta de alados de *A. aegypti* no peridomicílio em imóvel do bairro Coréia de Baixo, São Luís, Maranhão..... 38
- Figura 6.** Adultos de *A. aegypti* registrados nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão. Teste Kruskal-Wallis = 3,253983;  $p = 0,1965$  ..... 46
- Figura 7.** Adultos de *A. aegypti* registrados entre os meses de novembro de 2008 e agosto de 2009, nos períodos seco, chuvoso e intermediário em bairros do município de São Luís, Maranhão. Teste Kruskal-Wallis = 6,719955;  $p = 0,2423$  ..... 47
- Figura 8.** Adultos de *A. aegypti* registrados por bairro, no município de São Luís, Maranhão. Teste Kruskal-Wallis = 18,63852;  $p = 0,0094$  ..... 52
- Figura 9.** Amostras de *A. aegypti*, referentes ao período seco, visualizadas em gel de agarose a 2%, após coloração com brometo de etídio ..... 53
- Figura 10.** Amostras de *A. aegypti*, referentes ao período chuvoso, visualizadas em gel de agarose a 2%, após coloração com brometo de etídio ..... 55

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão, 2008-2009 ..... 45
- Tabela 2.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados mensalmente nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão, 2008-2009..... 46
- Tabela 3.** Médias mensais de temperatura registradas no município de São Luís, Maranhão, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009 ..... 48
- Tabela 4.** Médias mensais relativas à umidade relativa do ar, registradas no município de São Luís, Maranhão, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009 ..... 48
- Tabela 5.** Precipitação pluviométrica mensal registrada no município de São Luís, Maranhão, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009 ..... 48
- Tabela 6.** Associação entre quantidade de alados de *A. aegypti* e fatores abióticos nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão ..... 49
- Tabela 7.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados por bairro, em São Luís, Maranhão, no período de novembro e dezembro de 2008 ..... 50
- Tabela 8.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados por bairro em São Luís, Maranhão, no período de março e abril de 2009 ..... 50
- Tabela 9.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados por bairro em São Luís, Maranhão, no período de julho e agosto de 2009 ..... 51

<b>Tabela 10.</b> Relação de lotes de mosquitos <i>A. aegypti</i> por bairro, referente ao período seco (novembro e dezembro de 2008).....	53
<b>Tabela 11.</b> Relação de lotes de mosquitos <i>A. aegypti</i> por bairro, referente ao período chuvoso (março e abril de 2009) .....	54
<b>Tabela 12.</b> Relação de lotes de mosquitos <i>A. aegypti</i> por bairro, referente ao período intermediário (julho e agosto de 2009).....	56

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Oligonucleotídeos usados na RT-Semi-Nested-PCR.....	42
<b>Quadro 2.</b> Tamanho dos amplicons do VDEN produzido na RT-Semi-Nested-PCR.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Percentagem

µg – Micrograma

Abr. – Abril

Ago. – Agosto

AR – Artrópode

C6/36 – Clone de células de mosquito *Aedes albopictus*

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar ou DNA complementar

cm<sup>2</sup> – Centímetro quadrado

D1 – Ciclina 1

D2 – Ciclina 2

DC – Dengue Clássico

Dez. – Dezembro

DNase – Desoxirribonuclease

dNTPs – Deoxinucleotídeos

DS – Distrito Sanitário

DTT – Ditioneitol

Fc – Receptor de superfície

FD – Febre do Dengue

FHD – Febre Hemorrágica do Dengue

FNS – Fundação Nacional de Saúde

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEC – Instituto Evandro Chagas

IgG – Imunoglobulina G

Jul. – Julho

km<sup>2</sup> – Quilômetro quadrado

m – Metro

Mar. – Março

Máx. – Máxima

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

Mín. – Mínima

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro ou RNA mensageiro

MS – Ministério da Saúde

Nov. – Novembro

NS – Proteína não estrutural (non-structural protein)

NS1 – Proteína não estrutural 1

NS2a – Proteína não estrutural 2a

NS2b – Proteína não estrutural 2b

NS3 – Proteína não estrutural 3

NS4a – Proteína não estrutural 4a

NS4b – Proteína não estrutural 4b

NS5 – Proteína não estrutural 5

°C – Grau Celsius

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

p – Valor de p ou p-level

PBS – Solução Salina Fosfato Tamponada (Phosphate Buffered Saline solution)

pC – Proteína do Capsídeo

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction)

pE – Proteína do Envelope

pH – Potencial de hidrogênio

pM – Proteína da Membrana

PP – Precipitação Pluviométrica

prM – Proteína precursora da Proteína da Membrana

PVC – Policloreto de Vinila

R – Correlação de Spearman

RNA – Ácido Ribonucléico

RNase – Ribonuclease

RT – Transcriptase Reversa ou ARN polimerase dependente

SBF – Soro Bovino Fetal

SCD – Síndrome de Choque por Dengue

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMS – Secretaria Municipal de Saúde

T – Temperatura

TAQ DNA polimerase – *Thermus aquaticus* DNA polimerase

UI – Unidade Internacional

URA – Umidade Relativa do Ar

VDEN1 – Vírus Dengue 1

VDEN2 – Vírus Dengue 2

VDEN3 – Vírus Dengue 3

VDEN4 – Vírus Dengue 4

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE QUADROS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	22
2.1 Histórico do Dengue .....	22
2.2 Dengue no Brasil .....	23
2.3 Dengue no Maranhão.....	24
2.4 Dengue em crianças e mulheres .....	24
2.5 Vírus dengue.....	25
2.6 Incubação intrínseca e extrínseca do vírus dengue.....	27
2.7 Transmissão transovariana do vírus dengue.....	27
2.8 Vetores do dengue e dinâmica da transmissão .....	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral .....	30
3.2 Objetivos Específicos .....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Área de estudo .....	31
4.2 Amostragem .....	31
4.2.1 Cálculo do Tamanho da Amostra .....	34
4.2.2 Critérios de Não Inclusão e Exclusão.....	35
4.3 Caracterização das áreas de coleta.....	35
4.4 Coleta dos alados .....	36
4.4.1 Período de coleta .....	36
4.4.2 Técnica de captura de <i>A. aegypti</i> .....	36
4.5 Registro de material e Análises Viral e Molecular.....	39
4.5.1 Preparação dos espécimes para as análises.....	39
4.5.2 Manutenção de cultura de células clone da linhagem C6/36 de <i>A. albopictus</i> .....	39

4.5.3 Inoculações em cultura de células .....	40
4.5.4 Técnica de Imunofluorescência Indireta.....	40
4.5.5 Extrações do RNA viral.....	41
4.5.6 RT-Semi-Nested-PCR .....	41
4.6 Análise estatística .....	43
5 RESULTADOS .....	45
5.1 Densidade populacional de <i>A. aegypti</i> e variáveis climáticas .....	45
5.2 Densidade populacional de <i>A. aegypti</i> por bairros .....	49
5.3 Análises Viral e Molecular .....	52
6 CONCLUSÕES .....	57
REFERÊNCIAS .....	58
APÊNDICES .....	64
1 Apêndice 1.....	65
1.1 Primeiro Artigo Científico.....	65
1.1.1 Classificação do Qualis do Periódico na Área de Medicina II.....	65
1.1.2 Normais Editoriais.....	65
1.1.3 Artigo Completo.....	69
2. Apêndice 2.....	83
2.1 Segundo Artigo Científico.....	83
2.1.1 Classificação do Qualis do Periódico na Área de Medicina II.....	83
2.1.2 Normais Editoriais.....	83
2.1.3 Artigo Completo.....	86

## 1 INTRODUÇÃO

O dengue é considerado a doença de transmissão vetorial com maior crescimento no mundo. Essa enfermidade tem como agente etiológico tipos de vírus do Gênero *Flavivirus*, caracterizados por apresentarem quatro sorotipos antigenicamente distintos: Vírus Dengue 1 (VDEN1), Vírus Dengue 2 (VDEN2), Vírus Dengue 3 (VDEN3) e Vírus Dengue 4 (VDEN4) (RICO-HESSE, 1990; BENTE; RICO-HESSE, 2006).

A doença é transmitida por mosquitos do Gênero *Aedes* – *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) e a transmissão é feita pela picada de fêmeas infectadas (MARZOCHI, 1994). Após alimentar-se do sangue de um indivíduo doente e se tornar um vetor potencial, a fêmea está apta a transmitir o vírus, depois de oito a doze dias de incubação extrínseca. A doença se manifesta clinicamente em quinze dias após a picada do mosquito infectado. Humanos e mosquitos são os principais hospedeiros do vírus dengue, sendo que o vetor permanece infectado por toda a sua vida (GUBLER, 1997; WHO, 2001).

As características clínicas do dengue dependem da idade do paciente. Os lactentes e as crianças podem apresentar uma doença febril inespecífica, geralmente com uma erupção cutânea maculopapular. Adolescentes e adultos podem apresentar um sintoma febril discreto ou a doença incapacitante clássica, Dengue Clássico (DC) ou Febre do Dengue (FD) com febre alta de início abrupto, cefaléia intensa, dor retroorbital, mialgia e artralgia, náusea e vômitos, e erupção cutânea (WHO, 1997).

Em casos mais graves, o dengue pode ser acompanhado de epistaxe, hemorragia gengival e gastrointestinal, hematúria e metrorragia, caracterizando casos típicos de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), sendo a principal alteração fisiopatológica que determina a gravidade da doença, o extravasamento de plasma (WHO, 2006).

Na Síndrome de Choque por Dengue (SCD), a condição física dos pacientes deprime repentinamente, depois de uma febre que dura de dois a sete dias. Há sinais típicos de insuficiência respiratória: a pele se torna fria, manchada e congestionada, e, além disso, a frequência do pulso torna-se mais rápida. Os pacientes em estado de choque podem morrer se um tratamento adequado não for aplicado imediatamente (WHO, 2007).

O dengue é hoje a mais importante arbovirose (termo derivado do idioma inglês, como abreviatura da expressão *arthropod borne virus*, criada para designar os tipos de agentes virais veiculados por artrópodes) que afeta o homem e constitui um problema de saúde pública no mundo, ocorrendo principalmente em países tropicais. Cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente por vírus dengue, em mais de 100 países, e estima-se que destas, 400.000 sejam acometidas pela FHD, 550 mil doentes precisam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da doença (WHO, 2007; MACIEL et al., 2008).

O Brasil permaneceu por mais de 20 anos sem ocorrência da doença, desde a erradicação do *A. aegypti*, principal vetor do dengue, do território brasileiro em 1955 (TAUIL, 1986). A dispersão dos vírus dengue pelos países vizinhos levou a reintrodução do dengue no Brasil em 1981 com a epidemia ocasionada por VDEN1, em Boa Vista, Estado de Roraima (OSANAI, 1983; TRAVASSOS-DA-ROSA et al., 1998). Em 1986, o dengue apareceu no Estado do Rio de Janeiro, iniciando a grande epidemia causada por VDEN1 (SCHATZMAYR et al., 1986), que atingiu cerca de 95.000 casos até 1987 (FIGUEIREDO et al., 1998).

O problema da transmissão do dengue no Brasil tem se agravado nos últimos anos. O maior número de casos ocorreu em 1998, sendo registradas cerca de 560 mil notificações. Nos dois anos seguintes houve uma redução acentuada, chegando a 238 mil em 2000 (MS, 2001). Em 2009, o país registrou 387.158 casos no período de janeiro a junho (MS, 2009).

O aumento de casos do dengue é resultante da recente reinfestação do país pelo mosquito *A. aegypti*, também responsável pela transmissão da febre amarela urbana (FORATTINI, 2002). A expansão das áreas de ocorrência da doença associa-se ainda à urbanização, sem a devida estrutura de saneamento (COSTA et al., 2008). Tais fatores contribuem tanto para a dispersão ativa do mosquito como também para a disseminação dos quatro sorotipos da doença.

Considerando-se o dengue como problema de saúde pública e pelo fato de não existir vacina, a detecção e a sorotipagem de vírus dengue por Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), utilizando amostras do vetor são uma poderosa ferramenta para a vigilância epidemiológica. A presença do vírus em mosquitos coletados no campo permite a detecção de epidemias em um período anterior à explosão dos casos (ZEIDLER et al., 2008).

O presente estudo objetiva identificar a presença do vírus dengue em mosquitos *A. aegypti*, coletados no município de São Luís, Estado do Maranhão e relacionar a densidade dos vetores com dados climatológicos, nas estações seca e chuvosa da região.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Histórico do Dengue

Os primeiros relatos de uma epidemia semelhante ao DC aconteceram em 1779 e 1780, quando casos ocorreram em Batávia (Jacarta), no Cairo e na Filadélfia. Essa ocorrência simultânea de casos em três continentes indica que o vírus dengue, assim como o mosquito vetor, apresentava uma distribuição mundial nos trópicos há mais de 200 anos (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Após uma epidemia de dengue em Brisbane (Austrália) em 1905, na qual se estimou que um terço da mão-de-obra ficou incapacitada de trabalhar, Bancroft, um médico clínico geral que trabalhava na área rural de Brisbane, demonstrou que os mosquitos da espécie *A. aegypti* que se alimentaram em pacientes com dengue, foram capazes de transmitir o dengue para pessoas sadias (AASKOV, 2003). Em 1944, Sabin fez o primeiro isolamento do vírus dengue, tendo identificado dois sorotipos conhecidos como VDEN1 e VDEN2 (SABIN, 1952 apud. RUDNIK, 1967).

Até a II Guerra Mundial, as epidemias de dengue aconteciam em intervalos de 10 a 30 anos. Durante esse período, o dengue era considerado uma doença benigna de curso não fatal, proveniente dos visitantes dos trópicos. No referido período, ocorreu a co-circulação de sorotipos do vírus dengue no Sudeste Asiático com um aumento da atividade epidêmica. A primeira descrição de uma epidemia de FHD, foi em Manila, no ano de 1953 (GUBLER, 1998), quando foram isolados em pacientes com esta nova síndrome, os vírus dengue tipos 3 e 4 (SABIN, 1952 apud. RUDNIK, 1967). Juntamente com o crescimento descontrolado das cidades, epidemias de FHD se tornaram grandes problemas de saúde pública em vários países desta região (RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

No período de 1950 até meados de 1970 era rara a ocorrência de epidemias de dengue no continente americano, uma vez que o principal vetor da doença, o *A. aegypti* havia sido erradicado na maioria dos países da América Central e do Sul, devido à campanha realizada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). No final da década de 70, o programa perdeu forças e o mosquito voltou a ocupar os lugares dos quais havia sido eliminado. Durante o século XX, a transmissão urbana do vírus tornou-

se problema de saúde pública de relevância e não há mais a necessidade de transmissão enzoótica (exclusivamente entre animais) (GUBLER, 2002; GUZMÁN; KOURI, 2002).

## 2.2 Dengue no Brasil

No Brasil o dengue é hoje objeto da maior campanha de saúde pública, que se concentra no controle do *A. aegypti*, único vetor reconhecido como transmissor do vírus do dengue no país. Este mosquito está adaptado a se reproduzir nos ambientes doméstico e peridoméstico, utilizando-se de recipientes descartáveis e / ou que armazenam água potável e que acumulam água de chuvas, comumente encontrados nos lixos das cidades (TAUIL, 2001).

A primeira epidemia de dengue no país, com casos confirmados laboratorialmente, foi ocasionada pelos sorotipos 1 e 4 na cidade de Boa Vista, Estado de Roraima, e após um silêncio epidemiológico, o sorotipo VDEN1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro) e o Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais) em 1986-1987, espalhando-se pelo país desde então, com a entrada dos sorotipos VDEN2 em 1990-1991, e VDEN3 em 2001-2002. O dengue encontra-se presente em 3.794 municípios brasileiros, sendo responsável por cerca de 60% das notificações nas Américas. Além disso, os três sorotipos do dengue estão circulando em 25 dos 27 Estados brasileiros, contribuindo para a incidência das formas graves do dengue (FHD e SCD) nas cidades onde se registraram epidemias sequenciais por pelo menos dois sorotipos diferentes (SCHATZMAYR et al., 1986; HALSTEAD, 1990; NOGUEIRA et al., 1991; DONALISIO, 1999; NOGUEIRA et al., 2001; MIAGOSTOVICH et al., 2002; MS, 2008).

A região Nordeste sempre apresentou incidência elevada de casos de dengue. No período decorrido entre 1998 e 2001, chegou-se a 652.448 registros, correspondendo a 46,30% dos casos nacionais (FNS, 2002). Em 2006, foram registrados 83.365 casos, e em 2007, 148.303 ocorrências na mesma região do país (MS, 2007). No período de janeiro a junho de 2008, houve 242.740 casos confirmados na região, e em 2009, no mesmo período verificou-se uma redução para 128.322 casos (MS, 2009).

## 2.3 Dengue no Maranhão

No Estado do Maranhão, o *A. aegypti* foi introduzido em São Luís, capital do Estado, em 1969, mas só chamou a atenção dos órgãos de saúde no ano de 1995, quando se detectaram os primeiros casos de DC no setor da Cohab-Anil. Em 1996 ocorreu a primeira epidemia na ilha de São Luís, com 4.641 casos notificados, que prosseguiu até 1998, havendo dificuldade para confirmação dos casos em laboratório. Em 2001 foi isolado o sorotipo VDEN2, e até julho de 2006, os sorotipos VDEN1, VDEN2 e VDEN3 foram detectados como circulantes no Maranhão (MS, 2006). Em 2006 e em 2007 ocorreram 6.540 e 14.616 notificações, respectivamente (MS, 2006; 2007). Além disso, verifica-se o aumento da forma de FHD e a ocorrência de óbitos: foram registrados 163 casos durante o ano de 2007, sendo que destes, 7,97% evoluíram para óbito. O Maranhão também foi o terceiro Estado com o maior número de registros de FHD da região Nordeste e segunda posição em número de mortes pela doença em 2007, abaixo apenas do Piauí (MS, 2007).

Em 2008, foram notificados 1.256 casos suspeitos de dengue em São Luís. Destes, 608 foram confirmados para o DC e 82 para a FHD (SINAN, 2008). De janeiro a junho de 2009, foram notificados três casos de FHD no Estado e nenhum óbito (MS, 2009).

## **2.4 Dengue em crianças e mulheres**

Os primeiros relatos de FHD no Sudeste Asiático, foram registrados principalmente em crianças, pois nessa fase concentravam-se 95% dos casos, o que se considerou devido à imunidade existente na população adulta (CHAN, 1987). No entanto, algumas epidemias na Índia e em ilhas do Pacífico têm afetado em sua maioria, adultos (BHARAJ et al., 2008). Nos países da América conforme o local e a época, ora predomina em crianças, ora em adultos. Em alguns casos como na epidemia de Santiago de Cuba de 1997 por VDEN2 todos os pacientes que tiveram FHD eram adultos, pois a infecção precedente por VDEN1 havia ocorrido 20 anos antes (GUZMÁN et al., 2002).

O estudo cuidadoso da epidemia de 1981 em Cuba, causada por VDEN2, permitiu comparar adultos e crianças quanto à ocorrência das formas mais graves da doença, e verificou-se que as taxas de letalidade em crianças de três a quatro anos corresponderam a 25,4 por 10 mil infecções secundárias por VDEN2, taxas bem mais

altas do que nas crianças acima de cinco anos. Esses dados estabelecem uma poderosa associação entre a idade do indivíduo e o risco de morrer por uma síndrome de permeabilidade vascular durante uma segunda infecção por VDEN2 (GUZMÁN et al., 2002).

No Brasil, vários autores têm demonstrado a predominância dos casos de dengue em mulheres e crianças. Um estudo feito no município de Caxias, Estado do Maranhão, revelou que dos 905 casos da doença registrados na cidade entre os anos de 2000 a 2006, 53,48% corresponderam ao sexo feminino (FREITAS, 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por Vasconcelos (1993) em Araguaína, Estado do Tocantins; e Nascimento et al. (2003) em Belém, Estado do Pará. Uma das explicações para esta diferença entre os sexos seria a maior permanência da mulher no intradomicílio ou peridomicílio, locais onde predominantemente ocorre a transmissão do dengue (FORATTINI, 2002).

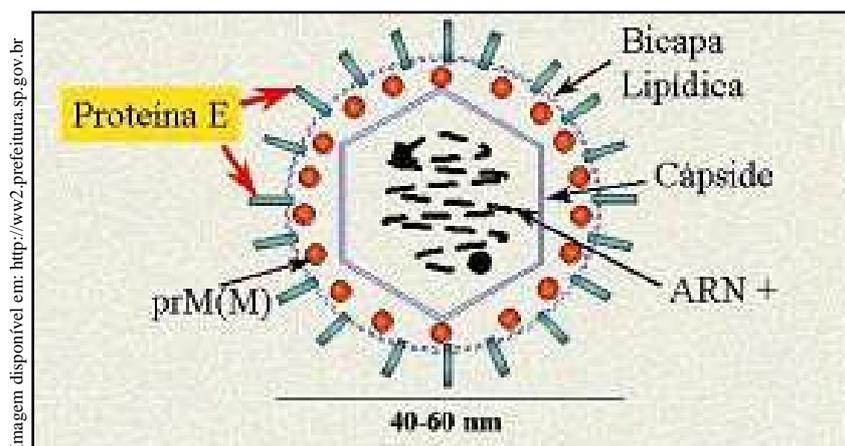
Ainda, em decorrência do processo de endemização do dengue no Brasil, após sua reemergência há 26 anos, vem ocorrendo uma mudança na sua distribuição etária, havendo um progressivo aumento da incidência e da gravidade em menores de 15 anos. No Maranhão, conforme dados da Secretaria Municipal de Saúde de São Luís, entre 2003 e 2007, foram notificados 9.046 casos de dengue na capital maranhense. Destes, 33% foram em crianças menores de 15 anos e a taxa de mortalidade foi de 74% nessa faixa etária, o que tem comprovado a maior agressividade do dengue em pessoas de menor idade (SMS, 2007). O mesmo quadro epidemiológico foi verificado em Manaus, Estado do Amazonas, entre 2006 e 2007, com aumento significativo da proporção de casos de dengue em menores de 15 anos e da proporção de casos graves neste grupo etário (ROCHA; TAUIL, 2009).

## 2.5 Vírus dengue

O vírus dengue é classificado em 04 sorotipos como um complexo dentro da Família *Flaviviridae*. A partícula viral madura é esférica com um diâmetro de cerca de 50 nanômetros, contendo uma única fita de mRNA (Ácido Ribonucléico mensageiro), com polaridade positiva e de aproximadamente 11.000 nucleotídeos (JONES et al., 2003) (Figura 1). O genoma apresenta uma pequena região 5' capeada e não codificadora, uma região aberta de leitura contendo mais de 10.000 nucleotídeos, e a

região não codificadora terminal 3', que é desprovida de cadeia poli-A. A janela aberta de leitura codifica três proteínas estruturais na terminação 5', que são as proteínas do capsídeo (pC), da membrana (pM) e do envelope (pE). A forma imatura do vírus contém a proteína precursora da proteína de membrana M (prM) (HENCHAL; PUTNAK, 1990; MONATH; HEINZ, 1996). A proteína C é a primeira a ser traduzida e se associa com o RNA para formar o nucleocapsídeo. A proteína prM é clivada após a saída do vírus da célula, deixando uma pequena proteína estrutural M ancorada no envelope do vírus e abandonando a maior parte, o segmento pr no meio extracelular. A formação da proteína M parece ser crucial, finalizando o evento da morfogênese do vírion (HENCHAL; PUTNAK, 1990). A glicoproteína do envelope é responsável por um grande espectro de atividades biológicas incluindo: ligação aos receptores celulares do hospedeiro, fusão à membrana e entrada nestas células, além do mais, ela estimula o sistema imune do hospedeiro através da indução de proteção (SAEJUNG et al., 2006).

O genoma do vírus dengue apresenta ainda sete proteínas NS (não estruturais): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, cujas funções ainda não estão totalmente identificadas. O vírus se acopla às células susceptíveis por dois mecanismos: o complexo vírus-anticorpo (não neutralizante tipo Imunoglobulina IgG) une-se ao receptor Fc dos macrófagos e monócitos; ou ainda pela união aos monócitos por via de um receptor viral sensível à tripsina (LEITMEYER et al., 1999).



**Figura 1.** Estrutura molecular do vírus dengue.

## 2.6. Incubação intrínseca e extrínseca do vírus dengue

A transmissão do vírus dengue compreende dois ciclos: o intrínseco, que ocorre no organismo humano durante a viremia, que vai de um dia antes do aparecimento da febre até o sexto dia da doença; e o extrínseco que ocorre no mosquito que após realizar repasto sanguíneo em indivíduo infectado na fase aguda da doença, adquire juntamente com o sangue o vírus que se multiplica, por um período de oito a doze dias e, a seguir, migra para as glândulas salivares do inseto. A partir de então, o vetor torna-se competente para transmitir a doença, até o final da vida, que é de seis a oito semanas para o *A. aegypti* (GUBLER, 1997; WHO, 2001).

Assim como outros arbovírus, a dinâmica de replicação do VDEN em mosquitos infectados oralmente, depende da temperatura nas quais os mosquitos são mantidos, a cepa, quantidade de vírus ingerido e possivelmente a espécie e cepa do mosquito. Todavia, o tempo entre a ingestão do VDEN pelo mosquito e sua habilidade de transmitir a infecção (período de incubação extrínseco) é altamente dependente da temperatura ambiental e da quantidade de vírus ingerido (RICO-HESSE, 1990; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994; FORATTINI, 2002).

## 2.7 Transmissão transovariana do vírus dengue

A transmissão transovariana do vírus dengue, onde a fêmea passa o patógeno para sua descendência, ocorre em laboratório e na natureza. Tipicamente, a fêmea do artrópode infecta seus descendentes em taxas bem reduzidas (BEATY; MARQUARDT, 1996). Rosen et al. (1983) observaram maior taxa de transmissão vertical em *A. albopictus* em comparação com *A. aegypti*, tendo sido detectada a transmissão do sorotipo 1 por esta espécie. Em outros trabalhos, a transmissão transovariana dos sorotipos 2, 3 e 4 também foi detectada em *A. aegypti* (KHIN; THAN, 1983; HULL et al., 1984). Segundo Joshi et al. (2002) a transmissão transovariana permite ao vírus dengue persistir em gerações sucessivas de mosquitos, a taxas de 5% a 26% em laboratório, embora na natureza não deva ocorrer taxa maior que 20%.

## 2.8 Vetores do dengue e dinâmica da transmissão

O *A. aegypti*, vetor do dengue e também da febre amarela urbana, é um mosquito altamente doméstico. Esta espécie pertence à Ordem Diptera, Família Culicidae. Os Dípteros se desenvolvem através de metamorfose completa (holometabolía), e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvários), pupa e adulto (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994; FORATTINI, 2002).

O *A. aegypti* foi importado da África para a América durante a colonização e o tráfico de escravos, disseminou-se para toda a faixa tropical em vista de seu peculiar modo de reprodução e hoje é considerado cosmopolita (EIRAS, 2000). No Hemisfério Ocidental a espécie está inteiramente relacionada com a população humana. Depósitos artificiais utilizados em abundância pela sociedade moderna, constituem os mais importantes criadouros responsáveis pela produção e manutenção de grandes populações do vetor. Esse mosquito costuma picar durante o dia e tem preferência acentuada por sangue humano (GADELHA; TODA, 1985; FORATTINI 2002).

A circulação dos vírus dengue depende da forma em que se organiza o espaço geográfico dos centros urbanos, a migração humana, o modo de vida de suas populações e os seus reflexos no ambiente. Esses fatores criam condições para a proliferação dos vetores, bem como a circulação e introdução de cepas virais (TEIXEIRA et al., 1999). Em muitas regiões tropicais as deficiências no abastecimento de água encanada fazem com que muitos habitantes passem a armazenar o líquido nos domicílios. Por sua vez, a aglomeração humana propicia condições para o aumento do número de mosquitos que entram em contato com a população. Outro hábito encontrado nas comunidades pobres vem a ser o acúmulo do lixo, no qual é possível encontrar recipientes passíveis de servir como criadouros (FORATTINI, 2002; PINHEIRO; TADEI, 2002).

Além disso, a propagação dos vírus causadores do dengue é facilitada pelo aumento da intensidade e velocidade do tráfego aéreo e terrestre. Esses agentes podem ser rapidamente transportados no sangue de pessoas portadoras da infecção, e, como o período de viremia é de aproximadamente oito dias, facilita sua disseminação pelo mosquito vetor (GUBLER, 1997).

Atualmente o eixo dos programas de controle do dengue tem sido o combate aos mosquitos vetores mediante a vigilância vetorial e a aplicação de inseticidas, que vem apresentando baixa eficácia e altos custos (PENNA, 2003; MACIEL et al., 2008).

O desenvolvimento de uma vacina contra os vírus do dengue, com eficácia e segurança, permitiria o controle da doença, de maneira semelhante ao controle da febre amarela. Entretanto, antes da disponibilização de uma vacina, recomenda-se estudos de soroincidência e/ou prevalência para avaliação epidemiológica de base populacional. Esta situação representa um desafio, pois grande parte dos municípios brasileiros não apresenta estrutura física, como a existência de laboratórios para a realização de análises moleculares que agilizem a diagnose em pacientes (MACIEL et al., 2008).

Considerando-se esta realidade, a detecção e a sorotipagem dos vírus dengue por RT-PCR, em mosquitos vetores vem se mostrando uma importante ferramenta na vigilância epidemiológica. A presença de vírus em mosquitos coletados em campo permite sua detecção de seis a oito semanas antes do início da epidemia (PINHEIRO et al., 2005; URDANETA et al., 2005; ZEIDLER et al., 2008). Vários protocolos de RT-PCR em amostras clínicas para detecção e identificação de sorotipos dengue têm sido utilizados para a detecção dos sorotipos do dengue em vários países (LANCIOTTI et al., 1992; HOUNG et al. 2001).

No Estado do Maranhão, foram iniciadas pesquisas para detectar e monitorar a circulação dos sorotipos do dengue em mosquitos na cidade de Caxias (LUCENA et al., 2007) e em São Luís (LUCENA et al., 2008). No entanto, estudos mais abrangentes tornam-se necessários, com coletas de mosquitos em diversas áreas da cidade e em diferentes períodos do ano para se obter informações do comportamento do vírus dengue de acordo com a sazonalidade e com os índices de densidade do vetor nos bairros do município de São Luís, Maranhão.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Geral

- Estimar a densidade populacional de *A. aegypti* e a taxa de infecção por vírus dengue em diferentes períodos no município de São Luís, Maranhão.

### 3.2 Específicos

- Calcular o índice de densidade populacional de alados de *A. aegypti* nos bairros de São Luís em diferentes períodos do ano;
- Correlacionar o índice populacional de *A. aegypti* com os fatores climáticos de precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura;
- Detectar os sorotipos do vírus dengue em *A. aegypti* coletados em diferentes bairros, usando as técnicas de RT-PCR e Isolamento Viral;
- Mapear as áreas das cidades de São Luís, com maior densidade de *A. aegypti* para subsidiar os Programas de Controle.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Área de estudo**

Trata-se de um estudo descritivo transversal, realizado no município de São Luís, situado na Ilha de São Luís, ao norte do Estado do Maranhão (02° 31' 47" Sul e 44° 18' 10" Oeste), altitude de 24,391 m e área de 827 Km<sup>2</sup> que corresponde aproximadamente a 0,24% do território do Estado. O município ocupa mais da metade da Ilha (57%) e a população se distribui entre centro urbano, com 122 bairros (que constituem a região semi-urbana) e em 122 povoados (que formam a zona rural). A cidade está dividida em 15 setores fiscais e 233 bairros, loteamentos e conjuntos residenciais (FUNDAÇÃO IBGE, 2002).

Atualmente o município encontra-se dividido em sete distritos sanitários (DS): Centro, Itaquí-Bacanga, Coroadinho, Cohab, Bequimão, Tirirical e Vila Esperança. Em 2000, a população era de 855.442 habitantes, dos quais 822.935 urbanos (381.019 masculinos; 441.916 femininos) e 32.507 rurais (16.676 masculinos e 15.831 femininos). A contagem da população em 2007 apontou 957.515 habitantes no Estado (IBGE, 2008).

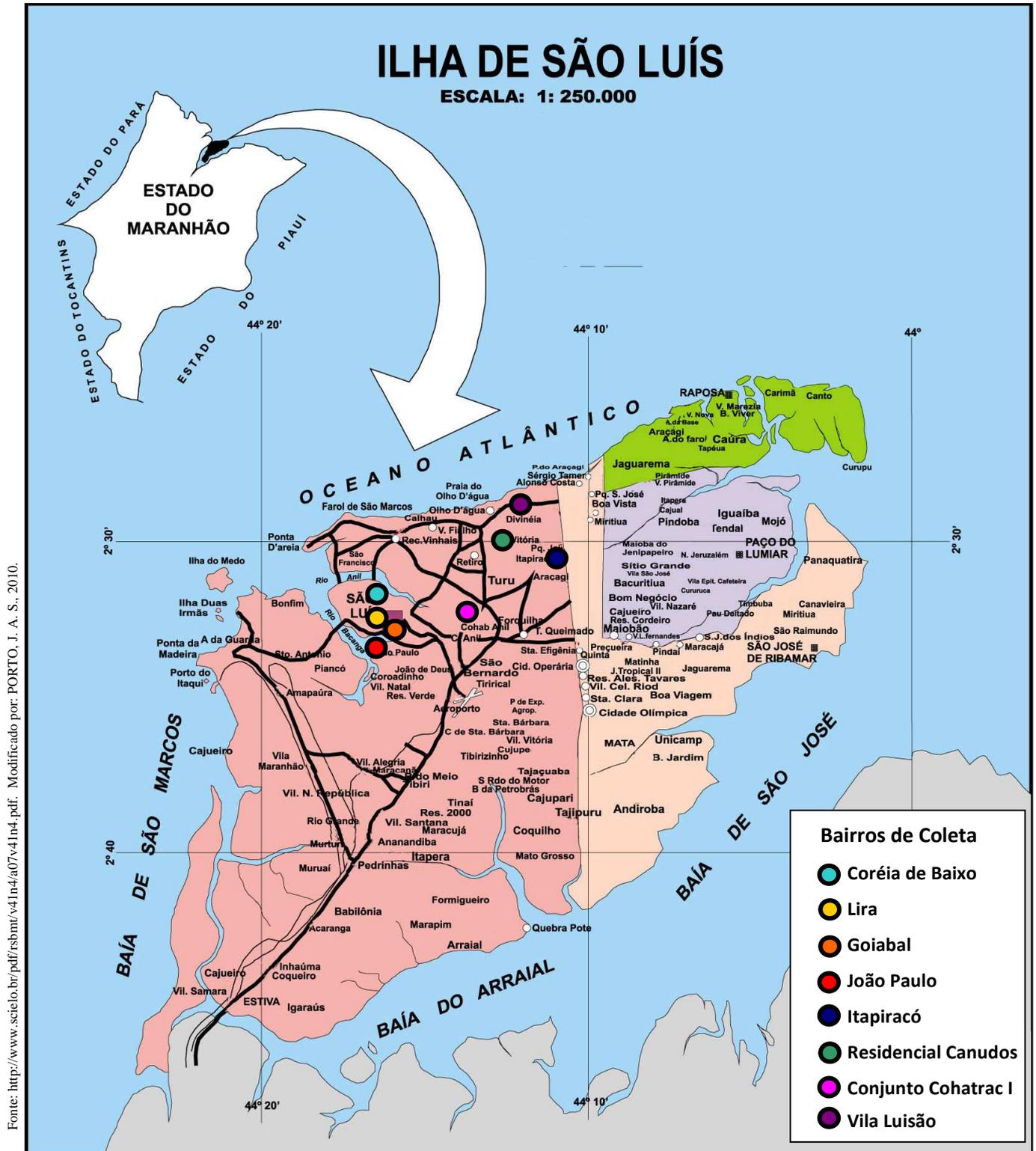
O clima é tropical quente e úmido, com duas estações: a chuvosa (janeiro a junho), com precipitação pluviométrica média de 1.954 mm; e a de estiagem (julho a dezembro). A temperatura varia entre 28 a 30°C, em média. A umidade relativa do ar apresenta valor máximo em abril, quando a região encontra-se no período chuvoso e temperaturas mais amenas, chegando a 79% em novembro, quando a região encontra-se na época seca e com temperaturas mais elevadas. O município de São Luís é cortado por diversos rios e estuários, entre eles pode-se citar: Anil, Bacanga, Tibiri, Mosquito, Mocajituba, Antônio Neves, São João e Paciência (SEBRAE-LEGAL, 2008).

### **4.2 Amostragem**

Foram selecionados aleatoriamente dois distritos do município de São Luís e em cada um destes, sorteados quatro bairros, totalizando oito bairros: Distrito Centro – Coréia de Baixo, Lira, Goiabal e João Paulo; e Distrito Cohab – Itapiracó, Residencial Canudos, Conjunto Cohatrac I e Vila Luisão (Figura 1). Em cada um dos bairros foram

sorteados quatro quarteirões e dez imóveis por quarteirão, perfazendo um total de 32 quarteirões e 320 imóveis. As visitas foram feitas juntamente com supervisores e agentes de controle do dengue da Secretaria Municipal de Saúde de São Luís.

Foram obtidos os níveis de precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura no Laboratório de Meteorologia da Universidade Estadual do Maranhão.



**Figura 2.** Mapa dos bairros de realização das coletas, município de São Luís, Maranhão.

### 4.2.1 Cálculo do Tamanho da Amostra

Os oito bairros pesquisados apresentam um total de 11.640 imóveis, segundo a listagem de Distritos e Bairros fornecida pela Vigilância Epidemiológica de São Luís. Considerando-se um erro amostral tolerável de 6% ( $E_0 = 0,06$ ), o número representativo de imóveis para a realização das coletas, segundo Barbetta (2002), foi obtido pelas fórmulas:

$$n_0 = \frac{1}{E_0^2} \qquad n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Onde:

$n_0$  = Primeira aproximação do tamanho da amostra;

$E_0^2$  = Erro amostral tolerável.

Onde:

$n$  = Tamanho da amostra;

$N$  = Número de elementos da população;

$n_0$  = Primeira aproximação do tamanho da amostra.

Sendo:

$E_0 = 0,06$ .

Temos:

$$n_0 = \frac{1}{E_0^2}$$

$$n_0 = \frac{1}{(0,06)^2}$$

$$n_0 = \frac{1}{0,0036}$$

$$n_0 = 277,7$$

Sendo:

$n_0 = 277,7$ ;

$N = 11.640$ .

Temos:

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

$$n = \frac{11.640 \times 277,7}{11.640 + 277,7}$$

$$n = \frac{3.232.428}{11.917,7}$$

$$n = 271,2 \text{ imóveis}$$

O número obtido no cálculo amostral (271,2 imóveis) fora arredondado para 272 imóveis, e dividido pela quantidade de bairros, ou seja, oito, resultando em 34 imóveis por bairro. Para que o número de imóveis fosse exato e distribuído de forma igual em cada quarteirão (ou seja, quatro quarteirões por bairro), preferiu-se aumentar em seis o número de imóveis para cada bairro, totalizando 40 imóveis visitados por bairro, sendo dez por quarteirão. No total foram pesquisados 320 imóveis.

#### **4.2.2 Critérios de Não Inclusão e Exclusão**

Não foram incluídos nesta pesquisa os imóveis sorteados que no momento da visita, encontravam-se abandonados, ou aqueles em que os proprietários estavam ausentes ou ainda nos que estivessem apenas menores de idade. Foram excluídos e substituídos na pesquisa, os imóveis que na segunda ou terceira coletas, houve recusa dos proprietários à entrada da equipe, ou que estivessem fechados.

#### **4.3 Caracterização das áreas de coletas**

No Distrito Centro os bairros de realização das coletas foram Coréia de Baixo, Lira, Goiabal e João Paulo. Estes se caracterizam pela existência de esgoto a céu aberto ou mesmo córregos próximos às residências, o que favorece o acúmulo de lixo jogado pela população. Nos imóveis é frequente o encontro de recipientes utilizados para armazenar água por falha no sistema de abastecimento público, o que propicia locais para o desenvolvimento de formas imaturas do *A. aegypti*. Apresentam pouca vegetação, grande parte das ruas é asfaltada e a maioria das casas possui terrenos extensos onde é comum a criação de animais domésticos.

No Distrito Cohab as coletas foram realizadas nos bairros Itapiracó, Residencial Canudos, Conjunto Cohatrac I e Vila Luisão. Com exceção do Conjunto Cohatrac I, os demais bairros apresentam extensa área de vegetação, o que contribui para a criação de insetos, e algumas ruas sem asfaltamento. No entanto, em todos, é possível observar lixo jogado em terrenos baldios, reservatórios para armazenamento de água e sistema de saneamento básico deficiente.

## **4.4 Coleta dos alados**

### **4.4.1 Período de Coleta**

As coletas foram feitas de novembro de 2008 a agosto de 2009, e eram realizadas de segunda-feira à sexta-feira, das 08h00 às 12h00 e das 14h00 às 18h00, sendo realizadas em três períodos: seco (de 20 de novembro ao dia 12 de dezembro de 2008), chuvoso (de 23 de março a 03 de abril de 2009), e intermediário (término do chuvoso e início do seco) (de 23 de julho a 05 de agosto de 2009). Os bairros foram visitados de forma alternada, sendo feitas coletas diárias em 20 imóveis por bairro (seguindo-se a sequência: Coréia de Baixo, Lira, Goiabal, João Paulo, Itapiracó, Residencial Canudos, Conjunto Cohatrac I e Vila Luisão) e ao término dos quatro dias de visita no último bairro, retornava-se ao primeiro, repetindo-se a sequência, em mais 20 imóveis, totalizando 40 imóveis por bairro e 320 imóveis no total.

Nos três períodos, tanto nos quarteirões como nos imóveis, quando ocorria algum imprevisto pelo imóvel estar fechado ou haver recusa, fazia-se a visita no imóvel mais próximo. Adotou-se este procedimento em todos os bairros, para manter constante o número de 10 imóveis visitados por quarteirão (em 10), e permitir as análises comparativas da densidade de mosquitos entre os bairros, além de minimizar os efeitos de variação dos fatores climáticos, como chuvas e mudanças de temperatura.

Do primeiro para o segundo ciclo de coletas, houve apenas 02 recusas de moradores (0,62% do total de imóveis visitados) e 23 imóveis fechados (7,18% do total de imóveis visitados). Após a substituição dos referidos imóveis, do segundo para o terceiro ciclo de coletas obteve-se 03 recusas (0,93% do total de imóveis visitados) e 29 imóveis fechados (9,06% do total de imóveis visitados).

### **4.4.2 Técnica de captura de *A. aegypti***

A captura dos alados foi feita utilizando-se aspirador mecânico movimentado embaixo dos móveis e nas partes mais elevadas da residência para aspiração dos mosquitos que estivessem em repouso. O aspirador constituiu-se de um tubo de material PVC de cerca de um metro de comprimento contendo uma hélice no seu interior (movimentada por bateria de 12 volts), que provoca uma corrente de ar que puxa os mosquitos (NASCI, 1981) (Figura 2). Realizou-se a aspiração em todos os cômodos do

imóvel (Figura 3) e na área peridomiciliar (Figura 4) em que havia a possibilidade de abrigar mosquitos. O esforço de coleta foi padronizado em 15 minutos para cada residência.

Os espécimes capturados foram anestesiados com algodão embebido em acetato de etila no interior do tubo vedado e em seguida, foram transferidos para gaiolas entomológicas, colocadas no interior de caixas de isopor, para manter a umidade necessária para mantê-los vivos durante o transporte até o laboratório onde foi feita a identificação em nível de espécie, com chaves de identificação (FORATTINI, 2002), no microscópio estereoscópico. A seguir, os espécimes foram separados por sexo, contados e acondicionados em microtubos, numerados sequencialmente e identificados com informações do bairro, local e data da coleta, quantidade de espécimes e sexo dos indivíduos, e mantidos em freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$  no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (CEPEC/UFMA).

Foto: BEZERRA, J. M. T. 2009



**Figura 3.** Aspirador mecânico acoplado à bateria, utilizado na captura de alados do *A. aegypti*.

Foto: IBIAPINA, S. S. 2008



**Figura 4.** Coleta de alados de *A. aegypti* no intradomicílio em imóvel do bairro Coréia de Baixo, São Luís, Maranhão.

Foto: IBIAPINA, S. S. 2008



**Figura 5.** Coleta de alados de *A. aegypti* no peridomicílio em imóvel do bairro Coréia de Baixo, São Luís, Maranhão.

## 4.5 Registro de material e Análises Viral e Molecular

Essa fase da pesquisa foi realizada no Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua, Estado do Pará. Os espécimes coletados foram encaminhados ao Laboratório de Entomologia onde foi feita a confirmação da identificação dos exemplares e aos Laboratórios de Cultura de Células e Biologia Molecular para o isolamento viral e a realização da RT-PCR, respectivamente.

Os exemplares de *A. aegypti* foram divididos em lotes que continham de 1 a 37 mosquitos para as análises viral e molecular, considerando-se os bairros e os períodos de coleta. Os exemplares machos e fêmeas foram analisados separadamente, para verificação de transmissão transovariana do vírus dengue. Quando houve o encontro de apenas um mosquito *A. aegypti* macho ou fêmea durante as coletas, o exemplar único constituía um lote.

Os lotes foram registrados no Livro de Identificação de Amostras da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC. O número de lotes diferiu em cada período: 13 no seco, 23 no chuvoso e 15 no intermediário.

### 4.5.1 Preparação dos espécimes para as análises

Os espécimes de *A. aegypti* foram macerados em solução de PBS (tampão salino fosfato pH 7,4) contendo albumina bovina a 0,75%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), de acordo com o Protocolo de Reynes (1995). O sobrenadante foi filtrado e a solução resultante armazenada a -86°C até a realização da extração do RNA.

### 4.5.2 Manutenção de cultura de células clone da linhagem C6/36 de *A. albopictus*

As técnicas para o isolamento viral foram a propagação e a manutenção das células clone C6/36 de *A. albopictus* (American Type Culture Cell Collection/ATCC), utilizando-se o meio Leibowitz modificado com glutamina (L-15), acrescido de triptose, aminoácidos não essenciais, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL), soro bovino fetal (SBF) a 5% para meio de crescimento e a 2% para o de manutenção. As

células foram mantidas à temperatura ambiente (em torno de 28°C) com repiques semanais em garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup> com 10 mL de meio de crescimento. A suspensão de células foi utilizada na proporção de 1:30 de meio de crescimento, sendo distribuídos 10 mL por garrafa de 25 cm<sup>2</sup> e 1 mL por tubo de 16 X 125 mm que se desejasse preparar para a inoculação.

#### **4.5.3 Inoculações em culturas de células**

A inoculação foi realizada em tubos de 16 X 125 mm com monocamadas celulares semiconfluentes, três a quatro dias após o repique. A suspensão de mosquitos foi filtrada e inoculada em tubos contendo células clone C6/36. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente (em torno de 28°C), e observados diariamente em microscópio óptico invertido até a verificação de efeito citopático ou até o 14º dia. Nesse ponto as suspensões de células foram coletadas, preparadas lâminas para confirmação da infecção viral por imunofluorescência indireta e extração de RNA para preparação do DNA complementar (cDNA) por RT-PCR ou armazenada em freezer - 80°C até o uso.

#### **4.5.4 Técnica de Imunofluorescência Indireta**

O método utilizado foi o descrito previamente por Gubler et al. (1984). Foram usadas células clone C6/36 inoculadas com suspensão de mosquitos e como controle negativo foram usadas células não infectadas. Os materiais contidos nas lâminas (20 µL em cada orifício) foram secos e fixados com acetona durante 10 minutos à temperatura de -20°C. Em seguida, foram acrescidos 10 µL de anticorpos policlonais antinflavivirus na diluição de 1:20 em PBS (pH 7,4) e as lâminas incubadas a 37°C em câmara úmida durante 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS por dez minutos, e uma vez, rapidamente, em água destilada e, secas à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 µL de conjugado (antianticorpo de camundongo ligado a isotiocianato de fluoresceína) na diluição de 1:900 em PBS pH 7,4, sendo então, as lâminas incubadas a 37°C em câmara úmida durante 30 minutos. Foi repetido o processo de lavagem com PBS e água destilada. Para as amostras positivas na triagem com anticorpos policlonais, foi feito um segundo procedimento desta vez utilizando

anticorpos monoclonais para identificar o sorotipo viral (VDEN1, VDEN2, VDEN3 e VDEN4). Finalmente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, montadas com glicerina tamponada pH 8,2 e lamínulas de vidro.

#### **4.5.5 Extrações do RNA viral**

O método usado para extração do RNA viral foi o do reagente Trizol LS (Invitrogen/San Diego/USA), seguindo orientações do fabricante. Para extração do RNA foi utilizado 0,25 mL de cada amostra e adicionado 0,75 mL de Trizol LS. Em seguida foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75 mL de Trizol LS. Após centrifugação a fase aquosa foi retirada cuidadosamente evitando perturbar as outras fases e colocadas em microtubos novos. Para precipitação do RNA, foi acrescido 0,5 mL de álcool isopropílico (essa quantidade é para cada 0,75 mL de Trizol LS), seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Após o sobrenadante ser desprezado e o microtubo seco à temperatura ambiente (em torno de 28°C), adicionou-se ao precipitado de RNA total 20 µL de água livre de RNase, e incubou-se 5 min a 65 °C, e resfriou-se por 5 min a temperatura ambiente. O RNA foi utilizado imediatamente, ou estocado a -86 °C até o momento do uso.

#### **4.5.6 RT-Semi-Nested-PCR**

O RNA extraído foi eluído em água livre de RNase. A Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa – Semi-Nested (RT-Semi-Nested-PCR) foi realizada de acordo com o Protocolo de Lanciotti et al. (1992), que inclui o gene proteína prM/M, onde a região amplificada neste teste corresponde a este gene proteína. Esta reação foi feita em duas etapas, iniciando com a síntese de cDNA a partir de RNA viral extraído. O RNA viral passou pelo processo de desnaturação inicial (90°C por dois minutos mais cinco minutos no gelo), depois foi preparada a mistura de reação contendo água (livre de RNase e DNase), Tampão 10X, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, DTT, oligonucleotídeos (D1+D2) (Quadro 1), Inibidor de Ribonuclease (5 U), TAQ DNA polimerase (1,25 U), enzima RT-MMLV (1,125 U) adicionada a mesma para ser levada ao termociclador com o seguinte programa: 1 ciclo a 45°C por 65 minutos, a 94°C por dois minutos; 35 ciclos

com oscilação de tempo e temperatura: 94°C por 60 segundos, 55°C por dois minutos, 72°C por três minutos; 72°C por 10 minutos.

A partir do produto da primeira PCR, foi realizada a segunda PCR, diluindo-a em água livre de RNase e DNase (1:100). Em seguida, foi retirada uma alíquota de 5 µL e preparada a mistura e reação: água livre de RNase e DNase, Tampão 10X, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, oligonucleotídeos (D1+TS 1-4) (Quadro 1), TAQ DNA polimerase (1,25 U), para ser adicionada a esta e levada ao termociclador com o seguinte programa: 18 ciclos a 94°C por 30 segundos; 55°C por um minuto; 72°C por dois minutos. O produto final foi analisado em gel de agarose a 2%, após coloração com brometo de etídio e a seguir exposto à luz ultravioleta, sendo fotografado, para análise comparativa do produto do RT-PCR com o marcador de peso molecular e controles (Quadro 2).

**Quadro 1.** Oligonucleotídeos usados na RT-Semi-Nested-PCR.

Oligo	Sequência	Posição no genoma (prM/M)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG -3'	134-161
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC -3'	616-644
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3	232-252
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421
TS4	5'-CTCTGTTGTCTAAAACAAGAGA-3'	506-527

Fonte: Lanciotti et al. (1992).

**Quadro 2.** Tamanho dos amplicons do VDENV produzido na RT-Semi-Nested-PCR.

Vírus	Tamanho do Amplicon
	1°PCR (pb)
Dengue	511
Vírus	2°PCR (pb)
VDEN1	482
VDEN2	119
VDEN3	290
VDEN4	395

Fonte: Lanciotti et al. (1992).

#### 4.6 Análise estatística

Os dados referentes à quantidade de alados de *A. aegypti* registrados por bairro, mês e períodos do ano, bem como os climáticos (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) foram avaliados quanto ao ajuste à distribuição normal, por meio do teste de Lilliefors e à homocedasticidade, por meio do teste de Levene (ZAR, 1999; STATSOFT, 2001). Sempre que os dados não se ajustaram à distribuição normal ou não tiveram variâncias homogêneas, estes foram transformados (ZAR, 1999) e, novamente, submetidos ao exame de ajuste à normalidade e à homocedasticidade. Sempre que as premissas relativas à utilização de testes paramétricos não puderam ser observadas, análises não-paramétricas correspondentes foram utilizadas.

Para examinar a variação da quantidade de alados de *A. aegypti* ao longo do período de amostragem foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis (ZAR, 1999). Para examinar a relação entre quantidade de alados *A. aegypti* e as variáveis climáticas de umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e temperatura do ar, foi utilizada a Correlação por postos de Spearman (ZAR, 1999). O nível de significância adotado para

se rejeitar a hipótese nula foi 5%. O banco dados deste estudo foi elaborado utilizando-se o software Microsoft Excel 2007 e as análises de dados foram realizadas por meio do pacote estatístico STATISTICA 6.0 (STATSOFT, 2001).

## 5 RESULTADOS

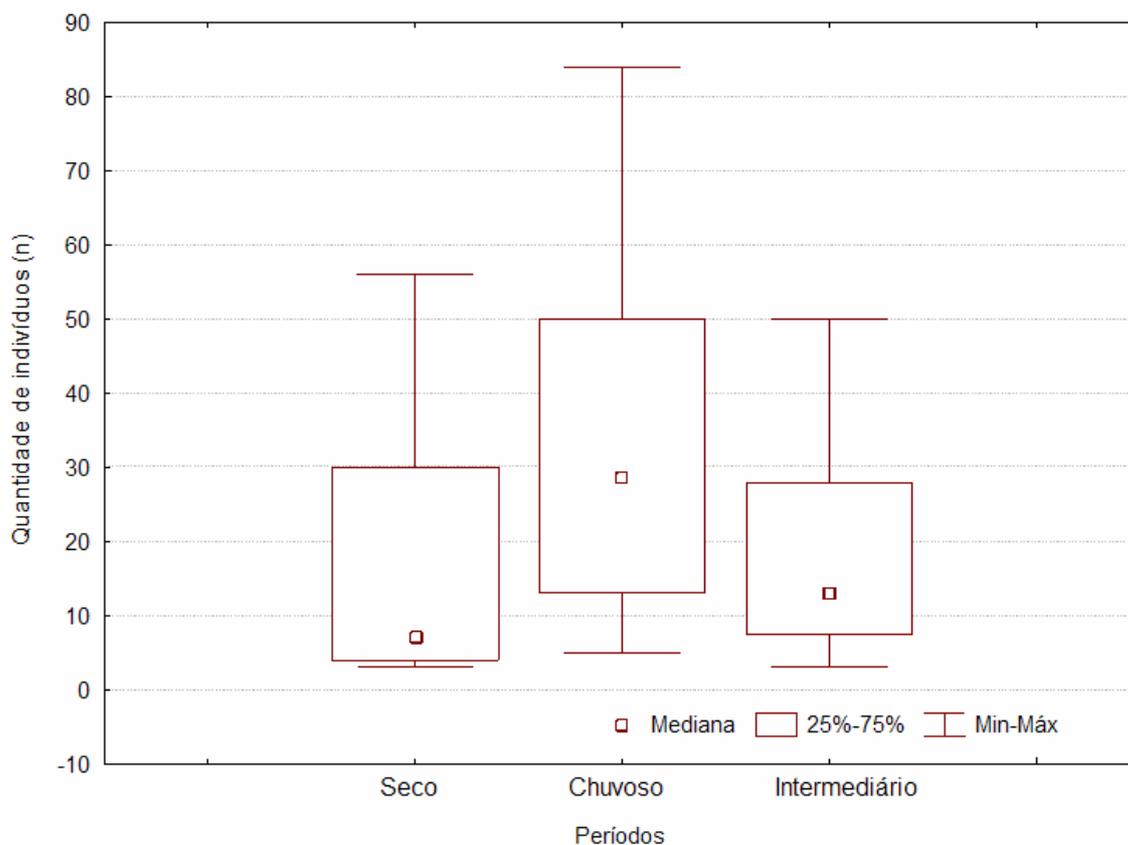
### 5.1 Densidade populacional de *A. aegypti* e variáveis climáticas

Foram coletados 563 mosquitos *A. aegypti*, nos oito bairros do município de São Luís em três períodos de realização da pesquisa: 141 no seco (novembro e dezembro de 2008), 272 no chuvoso (março e abril de 2009) e 150 no intermediário (julho e agosto de 2009). Destes 368 eram fêmeas (65,37%) e 195 machos (34,63%). O período chuvoso foi o que obteve a maior frequência de alados com 48,32% dos mosquitos coletados e o seco a menor, com 25,04% (Tabela 1), no entanto os testes estatísticos do número de espécimes em relação aos períodos de coleta, não mostraram diferença significativa ( $p = 0,1965$ ) (Figura 5).

Na comparação entre os meses, observou-se que em março de 2009 foi obtido o maior percentual de alados, com 30,75% e o mês de dezembro de 2008 o menor índice, com 9,41% (Tabela 2). A análise da densidade de *A. aegypti* por mês também não mostrou significância ( $p = 0,2423$ ) (Figura 6).

**Tabela 1.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão, 2008-2009.

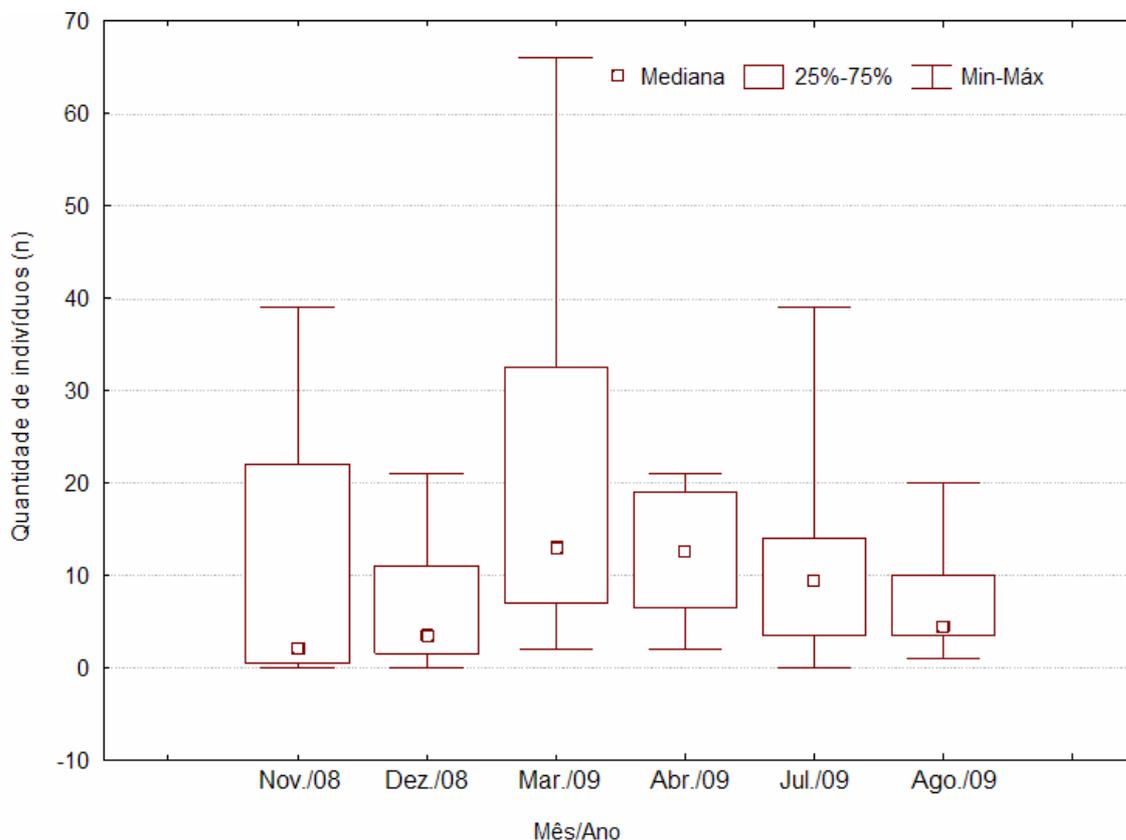
Período	Mosquitos <i>A. aegypti</i>		Total
	Fêmeas (♀)	Machos (♂)	
<b>Seco</b>	94	47	141 (25,04%)
<b>Chuvoso</b>	182	90	272 (48,32%)
<b>Intermediário</b>	92	58	150 (26,64%)
<b>Total</b>	368 (65,37%)	195 (34,63%)	563 (100,00%)



**Figura 6.** Adultos de *A. aegypti* registrados nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão. Teste Kruskal-Wallis = 3,253983;  $p = 0,1965$ .

**Tabela 2.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados mensalmente nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão, 2008-2009.

Mês e Ano	Mosquitos <i>A. aegypti</i>		Total
	Fêmeas (♀)	Machos (♂)	
Novembro de 2008	51	37	88 (15,63%)
Dezembro de 2008	43	10	53 (9,41%)
Março de 2009	122	51	173 (30,75%)
Abril de 2009	60	39	99 (17,58%)
Julho de 2009	58	35	93 (16,51%)
Agosto de 2009	34	23	57 (10,12%)
<b>Total</b>	<b>368 (65,37%)</b>	<b>195 (34,63%)</b>	<b>563 (100,00%)</b>



**Figura 7.** Adultos de *A. aegypti* registrados entre os meses de novembro de 2008 e agosto de 2009, nos períodos seco, chuvoso e intermediário em bairros do município de São Luís, Maranhão. Teste Kruskal-Wallis = 6,719955;  $p = 0,2423$ .

Em relação aos dados climatológicos, observou-se que o mês de novembro de 2008 registrou a maior temperatura média mensal, com 29,14°C, e o mês de abril de 2009 a menor do período de estudo, com 26,22°C (Tabela 3). Quanto à umidade relativa do ar média mensal, o mês de abril apresentou maior percentual com 87,43% e o mês de novembro a menor, com 68,16% (Tabela 4). Na comparação entre os meses em relação à precipitação pluviométrica mensal, novamente os meses de novembro e abril tiveram destaque. No primeiro não houve o registro de chuvas e no segundo, a maior incidência com o acumulado de 537,6 mm (Tabela 5). Os dados climatológicos foram fornecidos pelo Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, no município de São Luís, Maranhão.

**Tabela 3.** Médias mensais de temperatura registradas no município de São Luís, Maranhão, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009.

<b>Mês / Ano</b>	<b>Temperatura Média Máxima Mensal (°C)</b>	<b>Temperatura Média Mínima Mensal (°C)</b>	<b>Temperatura Média Mensal (°C)</b>
Nov. / 2008	32,88	25,40	29,14
Dez. / 2008	32,05	25,17	28,61
Mar. / 2009	29,90	23,46	26,68
Abr. / 2009	29,24	23,21	26,22
Jul. / 2009	32,16	22,30	27,23
Ago. / 2009	32,70	23,06	27,88

Fonte: Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão.

**Tabela 4.** Médias mensais relativas à umidade relativa do ar, registradas no município de São Luís, Maranhão, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009.

<b>Mês / Ano</b>	<b>Umidade Relativa do Ar Média Máxima Mensal (%)</b>	<b>Umidade Relativa do Ar Média Mínima Mensal (%)</b>	<b>Umidade Relativa do Ar Média Mensal (%)</b>
Nov. / 2008	82,26	54,06	68,16
Dez. / 2008	88,83	57,03	72,93
Mar. / 2009	97,93	72,45	85,19
Abr. / 2009	98,70	76,16	87,43
Jul. / 2009	99,41	65,29	82,35
Ago. / 2009	96,70	60,64	78,67

Fonte: Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão.

**Tabela 5.** Precipitação pluviométrica mensal registrada no município de São Luís, Maranhão, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009.

<b>Mês / Ano</b>	<b>Precipitação Pluviométrica Mensal (mm)</b>
Nov. / 2008	0
Dez. / 2008	40,6
Mar. / 2009	442,2
Abr. / 2009	537,6
Jul. / 2009	82,4
Ago. / 2009	23,2

Fonte: Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão.

Os resultados da correlação entre a quantidade de exemplares de *A. aegypti* e variáveis climáticas encontram-se na Tabela 6. Em relação aos fatores abióticos (médias de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) e o número de alados não foi observada correlação positiva e negativa. Os maiores valores de Correlação de Spearman referiram-se à associação entre número total de alados e a umidade relativa do ar média mensal, e número total de alados e a umidade relativa do ar média mensal mínima com 0,771429 ( $p = 0,072397$ ). A Correlação de Spearman mostrou menor valor de associação, em relação a número de alados e temperatura média mensal mínima, com - 0,771429 ( $p = 0,072397$ ).

**Tabela 6.** Associação entre quantidade de alados de *A. aegypti* e fatores abióticos nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão.

Pares de Variáveis	N	R	t	p-level
Alados x PP	6	0,714286	2,04124	0,110787
Alados x URA Média Mensal	6	0,771429	2,42467	0,072397
Alados x URA Média Mensal Máx.	6	0,6	1,5	0,208
Alados x URA Média Mensal Min.	6	0,771429	2,42467	0,072397
Alados x T Média Mensal	6	-0,2	-0,40825	0,704
Alados x T Média Mensal Máx.	6	-0,542857	-1,29279	0,265703
Alados x T Média Mensal Min.	6	-0,771429	-2,42467	0,072397

PP = Precipitação Pluviométrica; URA = Umidade Relativa do Ar; T = Temperatura; Máx. = máxima; Min. = mínima; R = Correlação de Spearman.

Fonte: Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão.

## 5.2 Densidade populacional de *A. aegypti* por bairros

Os espécimes foram coletados nos bairros previamente sorteados nos distritos Centro e Cohab. No período seco, o bairro João Paulo (Distrito Centro) apresentou maior percentual de alados, com 39,75%, (56 exemplares, sendo 37 fêmeas e 19 machos), sendo seguido pelo Goiabal (Distrito Centro) com 27,66% (39 espécimes, sendo 23 fêmeas e 16 machos). No mesmo período, o Coréia de Baixo (Distrito Centro) registrou a menor incidência de *A.aegypti*, com apenas 2,12% (3 exemplares fêmeas), sendo seguido pelos bairros Residencial Canudos (Distrito Cohab) (4 mosquitos, sendo 3 fêmeas e 1 macho) e Conjunto Cohatrac I (Distrito Cohab) (4 fêmeas) com 2,83% cada (Tabela 7).

**Tabela 7.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados por bairro, em São Luís, Maranhão, no período de novembro e dezembro de 2008.

Bairros	Número de exemplares (%)	Formas adultas	
		Fêmeas (♀)	Machos (♂)
Coréia de Baixo	3 (2,12)	3	-
Lira	6 (4,25)	6	-
Goiabal	39 (27,66)	23	16
João Paulo	56 (39,75)	37	19
Itapiracó	8 (5,67)	4	4
Residencial Canudos	4 (2,83)	3	1
Conjunto Cohatrac I	4 (2,83)	4	-
Vila Luisão	21 (14,89)	14	7
<b>Total</b>	<b>141 (100)</b>	<b>94 (72,86%)</b>	<b>47 (27,14%)</b>

Em relação ao período chuvoso, o bairro com maior quantidade de espécimes coletados também foi o João Paulo, com 84 exemplares (51 fêmeas e 33 machos), o equivalente a 30,91%. O segundo com maior densidade de alados de *A. aegypti* foi o Lira com 21,32% (58 exemplares, com 43 fêmeas e 15 machos). Os bairros com menores valores foram o Residencial Canudos, com 1,83% (5 alados, sendo 3 fêmeas e 2 machos) e o Itapiracó com 4,41% (12 exemplares, sendo 7 fêmeas e 5 machos) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados por bairro em São Luís, Maranhão, no período de março e abril de 2009.

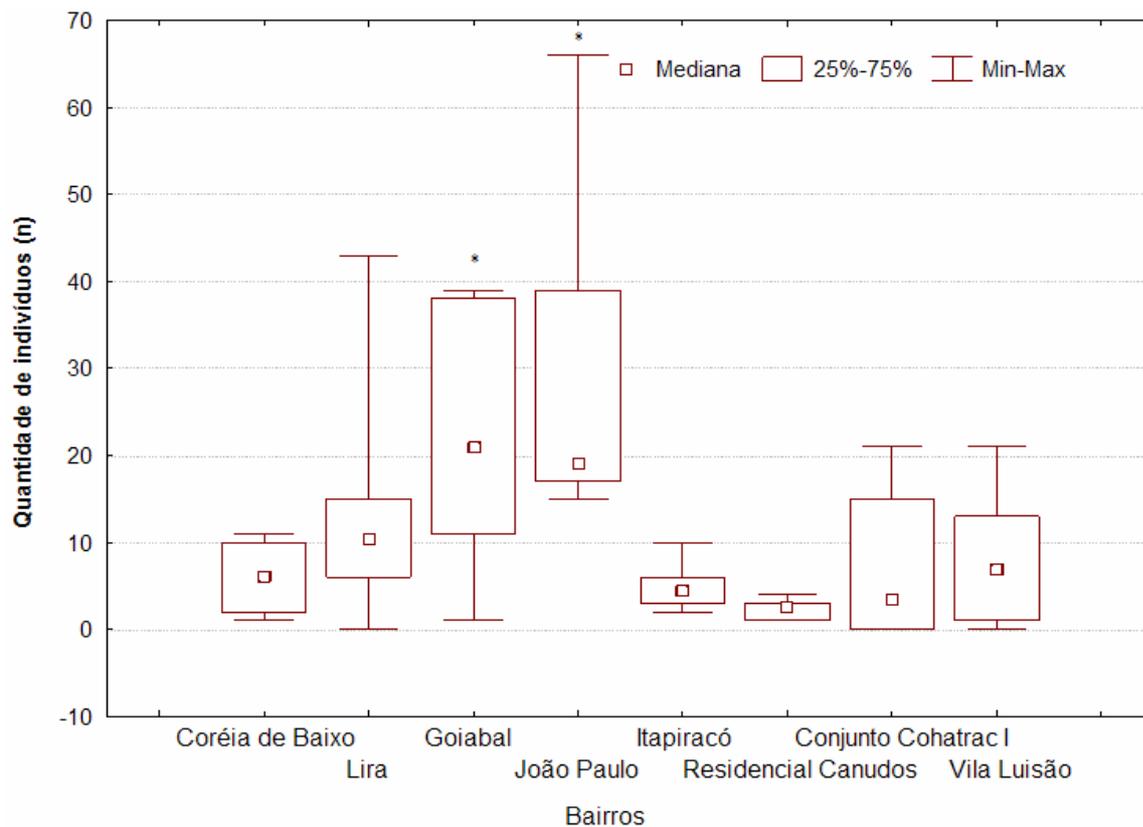
Bairros	Número de exemplares (%)	Formas adultas	
		Fêmeas (♀)	Machos (♂)
Coréia de Baixo	21 (7,72)	13	8
Lira	58 (21,32)	43	15
Goiabal	42 (15,44)	29	13
João Paulo	84 (30,91)	51	33
Itapiracó	12 (4,41)	7	5
Residencial Canudos	5 (1,83)	3	2
Conjunto Cohatrac I	36 (13,23)	30	6
Vila Luisão	14 (5,14)	6	8
<b>Total</b>	<b>272 (100)</b>	<b>182 (66,91%)</b>	<b>90 (33,09%)</b>

No período intermediário, os bairros com maior quantidade de espécimes coletados foram o Goiabal (Distrito Centro) com 33,35% (50 exemplares, sendo 33 fêmeas e 17 machos) e novamente o João Paulo com 23,33% (35 alados, com 22 fêmeas e 13 machos). Os menores valores foram registrados no Conjunto Cohatrac I com 2,00% (3 fêmeas) e Residencial Canudos com 3,33% (5 espécimes, sendo 2 fêmeas e 3 machos) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Frequência de exemplares de *A. aegypti* coletados por bairro em São Luís, Maranhão, no período de julho e agosto de 2009.

Bairros	Número de exemplares (%)	Formas adultas	
		Fêmeas (♀)	Machos (♂)
Coréia de Baixo	12 (8,00)	9	3
Lira	21 (14,00)	9	12
Goiabal	50 (33,35)	33	17
João Paulo	35 (23,33)	22	13
Itapiracó	10 (6,66)	7	3
Residencial Canudos	5 (3,33)	2	3
Conjunto Cohatrac I	3 (2,00)	3	-
Vila Luisão	14 (9,33)	7	7
<b>Total</b>	<b>150 (100)</b>	<b>92 (61,33%)</b>	<b>58 (38,67%)</b>

O Teste de Kruskal-Wallis mostrou que a quantidade de alados variou significativamente entre os bairros ( $p = 0,0094$ ), sendo o João Paulo e o Goiabal os que apresentaram as densidades mais elevadas considerando-se o total de espécimes coletados nos três períodos (Figura 7).



**Figura 8.** Adultos de *A. aegypti* registrados por bairro, no município de São Luís, Maranhão. Teste Kruskal-Wallis = 18,63852;  $p = 0,0094$ .

### 5.3 Análises Viral e Molecular

Foi realizado o isolamento viral de todas as amostras, porém não foi constatada positividade para os vírus dengue. Também se utilizou a RT-PCR para detecção do vírus dengue em todas as amostras com exceção da AR757003 (4 fêmeas de *A. aegypti* do Conjunto Cohatrac I), devido à reduzida quantidade de material sobrenadante. A Tabela 10 mostra a relação dos *A. aegypti* coletados no período seco, com os resultados das análises viral e molecular. Não se encontrou positividade em nenhum dos lotes (Figura 8).

**Tabela 10.** Relação de lotes de mosquitos *A. aegypti* por bairro, referente ao período seco (novembro e dezembro de 2008).

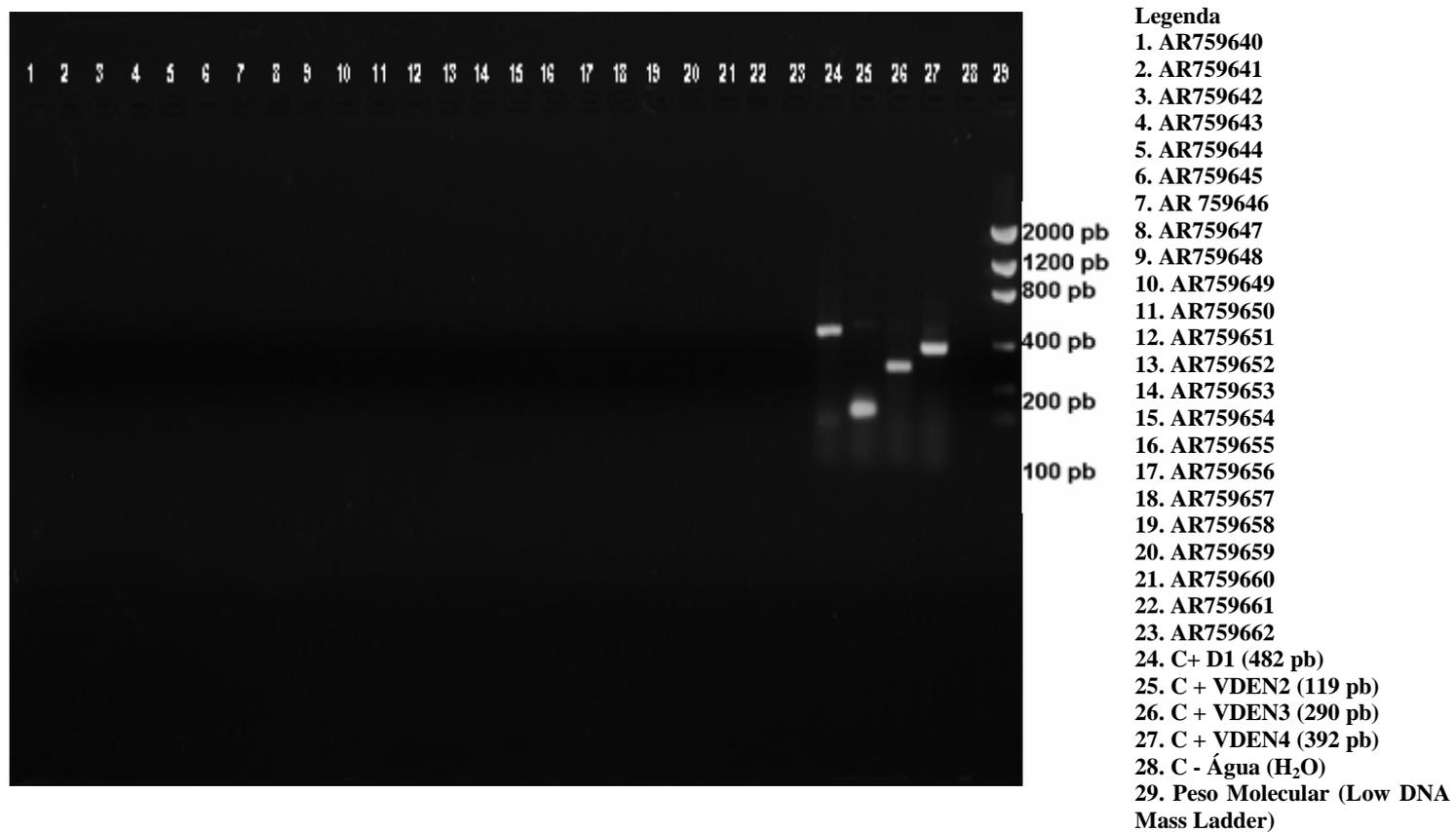
Número de registro	Mosquitos /lote	Bairro	Resultado do Isolamento Viral	Resultado da RT-PCR
AR756993	3 ♀	Coréia de Baixo	Negativo	Negativo
AR756994	6 ♀	Lira	Negativo	Negativo
AR756995	23 ♀	Goiabal	Negativo	Negativo
AR756996	16 ♂	Goiabal	Negativo	Negativo
AR756997	37 ♀	João Paulo	Negativo	Negativo
AR756998	19 ♂	João Paulo	Negativo	Negativo
AR756999	4 ♀	Itapiracó	Negativo	Negativo
AR757000	4 ♂	Itapiracó	Negativo	Negativo
AR757001	3 ♀	Residencial Canudos	Negativo	Negativo
AR757002	1 ♂	Residencial Canudos	Negativo	Negativo
AR757003	4 ♀	Conjunto Cohatrac I	Negativo	Não realizado
AR757004	14 ♀	Vila Luisão	Negativo	Negativo
AR757005	7 ♂	Vila Luisão	Negativo	Negativo

**Figura 9.** Amostras de *A. aegypti*, referentes ao período seco, visualizadas em gel de agarose a 2%, após coloração com brometo de etídio.

Em relação ao período chuvoso, a tentativa de isolamento viral e a RT-PCR das amostras também não atestaram positividade para os vírus dengue (Tabela 11 e Figura 9).

**Tabela 11.** Relação de lotes de mosquitos *A. aegypti* por bairro, referente ao período chuvoso (março e abril de 2009).

<b>Número de registro</b>	<b>Mosquitos /lote</b>	<b>Bairro</b>	<b>Resultado do Isolamento Viral</b>	<b>Resultado da RT-PCR</b>
AR759640	13 ♀	Coréia de Baixo	Negativo	Negativo
AR759641	8 ♂	Coréia de Baixo	Negativo	Negativo
AR759642	33 ♀	Lira	Negativo	Negativo
AR759643	10 ♀	Lira	Negativo	Negativo
AR759544	15 ♂	Lira	Negativo	Negativo
AR759645	16 ♀	Goiabal	Negativo	Negativo
AR759646	13 ♀	Goiabal	Negativo	Negativo
AR759647	13 ♂	Goiabal	Negativo	Negativo
AR759648	21 ♀	João Paulo	Negativo	Negativo
AR759649	20 ♀	João Paulo	Negativo	Negativo
AR759650	9 ♀	João Paulo	Negativo	Negativo
AR759651	25 ♂	João Paulo	Negativo	Negativo
AR759652	8 ♂	João Paulo	Negativo	Negativo
AR759653	1 ♀	João Paulo	Negativo	Negativo
AR759654	7 ♀	Itapiracó	Negativo	Negativo
AR759655	5 ♂	Itapiracó	Negativo	Negativo
AR759656	3 ♀	Residencial Canudos	Negativo	Negativo
AR759657	2 ♂	Residencial Canudos	Negativo	Negativo
AR759658	13 ♀	Conjunto Cohatrac I	Negativo	Negativo
AR759659	17 ♀	Conjunto Cohatrac I	Negativo	Negativo
AR759660	6 ♂	Conjunto Cohatrac I	Negativo	Negativo
AR759661	6 ♀	Vila Luisão	Negativo	Negativo
AR759662	8 ♂	Vila Luisão	Negativo	Negativo



**Figura 10.** Amostras de *A. aegypti* referentes ao período chuvoso, visualizadas em gel de agarose a 2%, após coloração com brometo de etídio.

Quanto ao período intermediário, a tentativa de isolamento viral e a RT-PCR das amostras mais uma vez não mostraram positividade para os vírus dengue (Tabela 12).

**Tabela 12.** Relação de lotes de mosquitos *A. aegypti* por bairro, referente ao período intermediário (julho e agosto de 2009).

<b>Número de registro</b>	<b>Mosquitos /lote</b>	<b>Bairro</b>	<b>Resultado do Isolamento Viral</b>	<b>Resultado da RT-PCR</b>
AR765222	9 ♀	Coréia de Baixo	Negativo	Negativo
AR765223	3 ♂	Coréia de Baixo	Negativo	Negativo
AR765226	9 ♀	Lira	Negativo	Negativo
AR765227	12 ♂	Lira	Negativo	Negativo
AR765230	33 ♀	Goiabal	Negativo	Negativo
AR765231	17 ♂	Goiabal	Negativo	Negativo
AR765234	22 ♀	João Paulo	Negativo	Negativo
AR765235	13 ♂	João Paulo	Negativo	Negativo
AR765238	7 ♀	Itapiracó	Negativo	Negativo
AR765239	3 ♂	Itapiracó	Negativo	Negativo
AR765256	2 ♀	Residencial Canudos	Negativo	Negativo
AR765257	3 ♂	Residencial Canudos	Negativo	Negativo
AR765269	3 ♀	Conjunto Cohatrac I	Negativo	Negativo
AR765271	7 ♀	Vila Luisão	Negativo	Negativo
AR765272	7 ♂	Vila Luisão	Negativo	Negativo

## 6 CONCLUSÕES

- A maior densidade de alados de *A. aegypti* foi registrada no período chuvoso, no município de São Luís, Maranhão;
- Não foi verificada correlação positiva e/ou negativa entre os fatores climáticos (precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura) e quantidade de alados de *A. aegypti* coletados;
- Todas as amostras de *A. aegypti* coletadas no município de São Luís foram negativas para o vírus dengue;
- O Distrito Centro apresentou os bairros com maior índice de infestação por *A. aegypti*, sendo o João Paulo e o Goiabal os que obtiveram densidade significativa em relação aos outros bairros no período de estudo.

## REFERÊNCIAS

- AASKOV, J. G. Dengue. **ADF Health Journal**. v. 4, p. 66-71, 2003.
- BARBETTA, P. A. **Estatística Aplicada às Ciências Sociais**. 5ª ed. Santa Catarina: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- BEATY, B. J.; MARQUARRDT, W. C. **The biology of disease vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996).
- BENTE, D. A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **National Institute of Health Public Access – Drug Discovery Today Disease Models**. v. 3, p. 97-103, 2006.
- BHARAJ, P. et al. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. **Virology Journal**. v. 5, p. 1-5, 2008.
- CHAN, V. F. Virological epidemiological studies of Dengue hemorrhagic fever in the Philippines. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 18, p. 275-277, 1987.
- CONSOLI, R. A. G. B.; & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.
- COSTA, F. S. et al. Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, p. 309-312, 2008.
- DONALISIO, M. R. **O dengue no espaço habitado**. 1 ed. São Paulo: HUCITEC, 1999.
- EIRAS, A. E. Culicidae. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.320-333.
- FIGUEIREDO, L. T. M. History, present and future of Dengue Fever in Brazil. In: TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J. F. S. (Orgs.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 154-163.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. v. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
- FREITAS, C. S. **Análise Epidemiológica dos casos de dengue registrados na cidade de Caxias, Maranhão de 2000 a 2006**. 2007. Monografia. Universidade Estadual do Maranhão, Caxias.
- FUNDAÇÃO IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002.

FNS – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Ministério da Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico 2002**. 2002. Ano 02 nº. 02. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 19 de nov. de 2007.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e Comportamento de *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Dengue**. v. 37, p. 376- 396, 1985.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. **Trends in Microbiology**. v. 10, p. 100-103, 2002.

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

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Orgs.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997. p. 1-22.

GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 33, p. 158-165, 1984.

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

GUZMÁN, M. G. et al. Effect age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infection Disease**. v. 6, p. 118-124, 2002.

HALSTEAD, S. B. Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 21: 636-641, 1990.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 3, p. 376-396, 1990.

HOUNG, H. S. et al. Development of a Fluorogenic RT-PCR System for Quantitative Identification of dengue Virus Serotypes 1-4 Using Conserved and Serotype-Specific 3'noncoding Sequences. **Journal of Virology Methods**. v. 95, p. 19-32, 2001.

HULL, B. et al. Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 33, 1248-1250, 1984.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Município de São Luís, Maranhão**. 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acessado em: 28 de mar. de 2008.

JONES, C. T. et al. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. **Virology Journal**. v.77, p. 7143-7149, 2003.

JOSHI, V. et al. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 67, p. 158-161, 2002.

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

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, p. 545-551, 1992.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Virology Journal**. v. 73, p. 4738-4747, 1999.

LUCENA, M. A. et al. Detecção dos sorotipos do vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) no município de São Luís, Estado do Maranhão com a técnica da Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). **Anais do 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Porto Alegre: Palloti, 2008. p 161.

LUCENA, M. A. et al. Investigação dos sorotipos do vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) no município de Caxias, Maranhão. **Anais do 43º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Campos do Jordão: TecArt, 2007. p. 49.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA JUNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**. v. 37, p. 111-130, 2008.

MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brazil – Situation, Transmission and Control – A Proposal for Ecological Control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 89, p. 235-245, 1994.

MIAGOSTOVICH, F. B. et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, p. 869-872, 2002.

MONATH, T. P.; HEINZ, F. X. Flaviviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, B. M.; HOWLEY, P. M. (Orgs.). **Fields Virology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 961-1034.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. **Informe Epidemiológico 17/2009**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 10 de set. de 2009.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2008. **Dengue - Boletim da semana 01/2008**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 08 de mar. de 2008.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2007. **Dengue – Balanço Dengue Janeiro a Julho de 2007**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 15 de nov. de 2007.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006. **Boletim Situação Epidemiológica da Dengue até Outubro de 2006 (semana epidemiológica Nº. 42)**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 15 de nov. de 2007.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. 2001. **Boletim Eletrônico Epidemiológico 2001**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 19 de nov. de 2007.

NASCI, R. S. A light weight battery-powered aspirator for collecting mosquitoes in the field. **Mosquitoes News**. v. 41, p. 808-811, 1981.

NASCIMENTO, D. M. B.; COELHO, R. N.; RODRIGUES, S. G. Diagnóstico laboratorial da dengue no município de Belém – Pará: a atuação do Laboratório Central do Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 1, p. 484-485, 2003.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R.; ZAGNE, S. M. O.; MARTINS, I. S. M. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 86, p. 269, 1991.

PENNA, M. L. F. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**. v.19, p. 305-309, 2003.

OSANAI, C. H. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 25, p. 53-54, 1983.

PINHEIRO, V. C. et al. 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, p. 833-839, 2005.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 44, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.org/scielo>>. Acessado em: 14 de out. de 2009.

REYNES, J. M. Tentatives d'isolement d'arbovirus a partir de serum ou surnagents de moustiques sur cellules APG1. **Institute Pasteur Guyane**. 1995.

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

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and Dengue haemorrhagic fever. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 352, p. 971-977, 1998.

ROCHA, L. A. da; TAUIL, P. L. Dengue em criança: aspectos epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, p. 18-22, 2009.

ROSEN, L. et al. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 32, p. 1108-1119, 1983.

SAEJUNG, W. et al. Enhancement of recombinant soluble dengue virus 2 envelope domain III protein production in *Escherichia coli* trxB and gor double mutant. **Journal of Bioscience Bioengineering**. v. 102, p. 333-339, 2006.

SABIN, A. 1952 apud. RUDNIK, A. *Aedes aegypti* and Hemorrhagic Fever. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 36, p. 528-532, 1967.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS-DA-ROSA, P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 81, p. 245-246, 1986.

SEBRAE-LEGAL. **Município de São Luís, Maranhão**. 2008. Disponível em: <<http://www.sebrae-legal.com.br/uf/maranhao>>. Acessado em: 24 de mar. de 2008.

SINAN – SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. **Casos de dengue registrados no município de São Luís, Maranhão**. 2008. Disponível em: <<http://www.saude.ma.gov.br>>. Acessado em: 13 de fev. de 2008.

SMS – SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. **Casos de Dengue em São Luís, Maranhão – 2003 a 2007**. 2007. Secretaria Municipal de Saúde: São Luís.

STATSOFT. 2001. **Statistica** (data analysis software system), version 6. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>.

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

TAUIL, P. L. O problema do *Aedes aegypti* no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 19, p. 1-3, 1986.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**. v. 8, p. 5-33, 1999.

TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A. et al. The first laboratory confirmed cases of dengue fever in Brazil: virus isolation and serological results In: TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J. F. S. (Orgs.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 164-167.

URDANETA, L. et al. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. **Infection Genetic Evolution**. v. 5, p. 177-84, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaína, Tocantins, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 35, p. 141-148, 1993.

ZAR, J. H. 1999. **Biostatistical Analysis**. Fourth Edition. Prentice Hall. 663 p.

ZEIDLER, J. D. et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and infestation dynamics in Roraima, Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v. 42, p. 1-6, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Impact of Dengue**. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>>. Acessado em: 23 de set. de 2009.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on Dengue**. 2006. Disponível em: <[http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg\\_dengue\\_2htm](http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2htm)>. Acessado em: 15 de jul. de 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue Hemorrágica: Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle**. 2 ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, 2001.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. 2 ed. Genebra: WHO, 1997.

## **APÊNDICES**

## 1 Apêndice 1

### 1.1 Primeiro Artigo Científico

#### 1.1.1 Classificação do Qualis do Periódico na área de Medicina II:

ISSN	Título	Estrato	Área de Avaliação
0034-8910	Revista de Saúde Pública (USP. Impresso)	B2	MEDICINA II

#### 1.1.2 Normas Editoriais:

**Artigos Originais.** Incluem estudos observacionais, estudos experimentais ou quase-experimentais, avaliação de programas, análises de custo-efetividade, análises de decisão e estudos sobre avaliação de desempenho de testes diagnósticos para triagem populacional. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões. Incluem também ensaios teóricos (críticas e formulação de conhecimentos teóricos relevantes) e artigos dedicados à apresentação e discussão de aspectos metodológicos e técnicas utilizadas na pesquisa em saúde pública. Neste caso, o texto deve ser organizado em tópicos para guiar os leitores quanto aos elementos essenciais do argumento desenvolvido.

**Preparação do Manuscrito.** Devem ser digitados em extensão .doc, .txt ou .rtf, com letras Arial, corpo 12, página em tamanho A-4, incluindo resumos, agradecimentos, referências e tabelas. Todas as páginas devem ser numeradas. Deve-se evitar no texto o uso indiscriminado de siglas, excetuando as já conhecidas. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Para tanto os autores devem explicitar em Métodos que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsinque e aprovada pela comissão de ética da instituição onde a pesquisa foi realizada. Aceitam-se manuscritos nos idiomas português, espanhol e inglês. Para aqueles submetidos em português oferece-se a opção de tradução do texto completo para o inglês e a publicação adicional da versão em inglês em meio eletrônico. Independentemente do idioma empregado, todos manuscritos devem apresentar dois

resumos, sendo um em português e outro em inglês. Quando o manuscrito for escrito em espanhol, deve ser acrescentado um terceiro resumo nesse idioma.

**Dados de identificação:**

- a) Título do artigo - deve ser conciso e completo, limitando-se a 93 caracteres, incluindo espaços. Deve ser apresentada a versão do título em inglês.
- b) Título resumido - com até 45 caracteres, para fins de legenda nas páginas impressas.
- c) Nome e sobrenome de cada autor, seguindo formato pelo qual é indexado.
- d) Instituição a que cada autor está afiliado, acompanhado do respectivo endereço (uma instituição por autor).
- e) Nome e endereço do autor responsável para troca de correspondência.
- f) Se foi subvencionado, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.
- g) Se foi baseado em tese, indicar o nome do autor, título, ano e instituição onde foi apresentada.
- h) Se foi apresentado em reunião científica, indicar o nome do evento, local e data da realização.

**Descritores.** Devem ser indicados entre 3 e 10, extraídos do vocabulário "[Descritores em Ciências da Saúde](#)" (DeCS), quando acompanharem os resumos em português, e do [Medical Subject Headings \(MeSH\)](#), para os resumos em inglês. Se não forem encontrados descritores disponíveis para cobrirem a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos ou expressões de uso conhecido.

**Agradecimentos.** Devem ser mencionados nomes de pessoas que prestaram colaboração intelectual ao trabalho, desde que não preencham os requisitos para participar da autoria. Deve haver [permissão expressa](#) dos nomeados (ver documento Responsabilidade pelos Agradecimentos). Também podem constar desta parte agradecimentos a instituições quanto ao apoio financeiro ou logístico.

**Referências.** As referências devem ser ordenadas alfabeticamente, numeradas e normalizadas de acordo com o estilo Vancouver. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Index Medicus, e grafados no formato itálico. No caso de publicações com até 6 autores, citam-se todos; acima de 6, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina "et al". Exemplos:

Fernandes LS, Peres MA. Associação entre atenção básica em saúde bucal e indicadores socioeconômicos municipais. *Rev Saude Publica*. 2005;39(6):930-6.

Forattini OP. Conceitos básicos de epidemiologia molecular. São Paulo: Edusp; 2005.

Karlsen S, Nazroo JY. Measuring and analyzing "race", racism, and racial discrimination. In: Oakes JM, Kaufman JS, editores. *Methods in social epidemiology*. San Francisco: Jossey-Bass; 2006. p. 86-111.

Zinn-Souza LC, Nagai R, Teixeira LR, Latorre MRDO, Roberts R, Cooper SP, et al . Fatores associados a sintomas depressivos em estudantes do ensino médio de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2009; 42(1):34-40.

Para outros exemplos recomendamos consultar o documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Medical Publication" (<http://www.icmje.org>). Comunicação pessoal, não é considerada referência bibliográfica. Quando essencial, pode ser citada no texto, explicitando em rodapé os dados necessários. Devem ser evitadas citações de documentos não indexados na literatura científica mundial e de difícil acesso aos leitores, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento; quando relevantes, devem figurar no rodapé das páginas que as citam. Da mesma forma, informações citadas no texto, extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, não devem fazer parte da lista de referências, mas podem ser citadas no rodapé das páginas que as citam.

**Citação no texto.** Deve ser indicado em expoente o número correspondente à referência listada. Deve ser colocado após a pontuação, nos casos em que se aplique. Não devem ser utilizados parênteses, colchetes e similares. O número da citação pode ser acompanhado ou não do (s) nome (s) do (s) autor (es) e ano de publicação. Se forem

citados dois autores, ambos são ligados pela conjunção "e"; se forem mais de dois, cita-se o primeiro autor seguido da expressão "et al". Exemplos:

Segundo Lima et al<sup>9</sup> (2006), a prevalência se transtornos mentais em estudantes de medicina é maior do que na população em geral.

Parece evidente o fracasso do movimento de saúde comunitária, artificial e distanciado do sistema de saúde predominante.<sup>12,15</sup>

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do (s) autor (es) do manuscrito.

**Tabelas.** Devem ser apresentadas separadas do texto, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização da revista que a publicou, por escrito, para sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar o manuscrito submetido à publicação. Quadros são identificados como Tabelas, seguindo uma única numeração em todo o texto.

**Figuras.** As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.), devem ser citadas como figuras. Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto; devem ser identificadas fora do texto, por número e título abreviado do trabalho; as legendas devem ser apresentadas ao final da figura; as ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução, com resolução mínima de 300 dpi. Não se permite que figuras representem os mesmos dados de Tabela. Não se aceitam gráficos apresentados com as linhas de grade, e os elementos (barras, círculos) não podem apresentar volume (3-D). Figuras coloridas são publicadas excepcionalmente. Nas legendas das figuras, os símbolos, flechas, números, letras e outros sinais devem ser identificados e seu significado esclarecido. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução. Estas autorizações devem acompanhar os manuscritos submetidos à publicação.

### 1.1.3 Artigo Completo:

**Título original: Estudo da circulação de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no município de São Luís, Maranhão.**

**Título em inglês: Study of the circulation of virus dengue in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in São Luís, Maranhão.**

**Título corrido: Sorotipos do dengue em São Luís, Maranhão.**

Juliana Maria Trindade Bezerra<sup>1,4</sup>

Ana Cecília Ribeiro Cruz<sup>2</sup>

Mayra de Oliveira e Silva<sup>2</sup>

Eliana Vieira Pinto da Silva<sup>2</sup>

Wanderli Pedro Tadei<sup>3</sup>

Valéria Cristina Soares Pinheiro<sup>4</sup>

1. Programa de Pós Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão – Mestrado Acadêmico. A correspondência deve ser dirigida a: Juliana Maria Trindade Bezerra. Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Entomologia Médica, Universidade Estadual do Maranhão – Centro de Estudos Superiores de Caxias. Praça Duque de Caxias s/n Morro do Alecrim, Caxias – MA, 65600-000, Brasil. E-mails: [jmt\\_bezerra@hotmail.com](mailto:jmt_bezerra@hotmail.com); [valeria@cesc.uema.br](mailto:valeria@cesc.uema.br).

2. Instituto Evandro Chagas – Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas. Rodovia BR-316 km 7 s/n Levilândia, Ananindeua – PA, 67030-000, Brasil.

3. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Laboratório de Malária e Dengue. Avenida André Araújo 2936 Aleixo, Manaus – AM, 69060-001, Brasil.

4. Universidade Estadual do Maranhão – Centro de Estudos Superiores de Caxias. Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Entomologia Médica, Universidade Estadual do Maranhão – Centro de Estudos Superiores de Caxias. Praça Duque de Caxias s/n Morro do Alecrim, Caxias – MA, 65600-000, Brasil.

Parte da dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão em 2010.

## **RESUMO**

**OBJETIVO:** Detectar a presença do vírus dengue em alados de *Aedes aegypti*.

**MÉTODOS:** Oito bairros foram selecionados aleatoriamente para coleta de alados de *Aedes aegypti* no município de São Luís Maranhão, no Nordeste do Brasil. Foram visitados 320 imóveis, sendo 40 por bairro, em três períodos: seco (novembro e dezembro de 2008), chuvoso (março e abril de 2009) e intermediário (julho e agosto de 2009), tanto no intradomicílio quanto no peridomicílio. Para coleta dos alados, utilizou-se aspirador mecânico acoplado a uma bateria. Após contagem, identificação e armazenamento a  $-86^{\circ}\text{C}$ , os espécimes foram submetidos a análises de detecção viral por métodos moleculares (RT-PCR) e Isolamento Viral em cultura de células de *Aedes albopictus*, linhagem C6/36.

**RESULTADOS:** Foram coletados 563 mosquitos *Aedes aegypti*, com maior frequência de alados no período chuvoso, 272 espécimes (48,32%). Os testes estatísticos do número de alados em relação aos períodos e meses de coleta, não mostraram diferença significativa. Os exemplares de *Aedes aegypti* foram divididos em lotes para as análises moleculares, considerando-se os bairros de coleta. O número de lotes diferiu em cada período: 13 no seco, 23 no chuvoso e 15 no intermediário. O isolamento viral e a RT-PCR dos mosquitos foram negativos.

**CONCLUSÕES:** A não detecção de vírus dengue em mosquitos pode estar relacionada ao reduzido número de casos de dengue registrados no município de São Luís no período de estudo, indicando baixa endemicidade, o que dificulta a detecção viral em vetores artrópodes.

**DESCRITORES:** *Aedes aegypti*. Vírus Dengue. Isolamento viral. RT-PCR.

## **ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** To detect the presence of dengue virus in winged *Aedes aegypti*.

**METHODS:** Eight districts were selected randomly for collection of winged *Aedes aegypti* in the municipality of São Luís, Maranhão, in northeastern Brazil. 320 properties were visited, with 40 per quarter, in three periods: dry (November-December 2008), rainy (March-April 2009) and intermediate (July / August 2009), both indoors and outside the home. For collection of winged insects, we used mechanical vacuum attached to a battery. After counting, identification and storage at - 86 °C, the specimens were submitted to analysis of viruses by molecular methods (RT-PCR) and viral isolation in cell cultures of *Aedes albopictus*, C6/36 strain.

**RESULTS:** We collected 563 mosquitoes *Aedes aegypti*, with higher frequency of winged in the rainy season, 272 specimens (48.32%). Statistical tests of the number of winged individuals in respect of periods and months of collection, showed no significant difference. Copies of *Aedes aegypti* were divided into pools for molecular analysis, considering the neighborhoods of collection. The number of pools differed in each period: 13 in the dry, 23 in rainy and 15 in the intermediate. The virus isolation and RT-PCR of mosquitoes were negative.

**CONCLUSIONS:** The failure to detect dengue virus in mosquitoes may be related to the low number of reported dengue cases in the city of São Luís during the study period, indicating low endemic, making it difficult to detect viral vector arthropods.

**KEY WORDS:** *Aedes aegypti*. Dengue Virus Dengue. Viral isolation. RT-PCR.

## INTRODUÇÃO

No Brasil o dengue é hoje objeto da maior campanha de saúde pública, que se concentra no controle do *Aedes aegypti*, único vetor reconhecido como transmissor do vírus do dengue no continente americano. Este mosquito está adaptado a se reproduzir nos ambientes doméstico e peridoméstico, utilizando-se de recipientes descartáveis e / ou que armazenam água potável e que acumulam água de chuvas, comumente encontrados nos lixos das cidades<sup>1</sup>.

No Estado do Maranhão, o *Aedes aegypti* foi introduzido em São Luís, capital do Estado, em 1969, mas só chamou a atenção dos órgãos de saúde pública no ano de 1995, quando foram notificados os primeiros casos de dengue clássico (DC). Em 2001 foi isolado o vírus dengue sorotipo 2 (VDEN2), e até julho de 2006, os sorotipos VDEN1, VDEN2 e VDEN3 foram detectados como circulantes no Estado<sup>2</sup>. Nos anos de 2006 e 2007 ocorreram 6.540 e

14.616 notificações, respectivamente<sup>2,3</sup>. Além disso, foi observado o aumento da forma hemorrágica do Dengue (FHD) e a ocorrência de óbitos. Durante o ano de 2007 foram notificados 163 casos, sendo que destes, 7,97% evoluíram para óbito<sup>3</sup>. Em 2008, foram notificados 1.256 casos suspeitos de dengue em São Luís, destes, 608 foram confirmados para DC e 82 evoluíram para a FHD<sup>4</sup>. De janeiro a julho de 2009, o Estado registrou 291 casos suspeitos da doença, com apenas três casos confirmados para a FHD e nenhum óbito<sup>5</sup>.

Considerando-se o dengue como problema de saúde pública e pelo fato de não existir vacina, a detecção e a sorotipagem do vírus dengue por Transcriptase Reversa seguida por Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) são uma poderosa ferramenta para a vigilância epidemiológica, utilizando amostras do vetor, pois a presença do vírus em mosquitos coletados no campo permite a detecção de sorotipos de seis a oito semanas antes do início das epidemias<sup>6,7</sup>.

O objetivo do presente estudo foi identificar a presença do vírus dengue em adultos de *Aedes aegypti* em diversas áreas do município de São Luís, Maranhão, e em diferentes períodos do ano para se obter informações do comportamento do vírus dengue de acordo com as estações seca e chuvosa.

## **MÉTODOS**

### Área de Coleta

A pesquisa foi realizada no Município de São Luís, situado na Ilha de São Luís, ao norte do Estado do Maranhão (02° 31' 47" Sul e 44° 18' 10" Oeste), altitude de 24,391 m e área de 827 Km<sup>2</sup> que corresponde aproximadamente a 0,24% do território do Estado, e com população de 957.515 habitantes<sup>8</sup>. O clima é tropical quente e úmido, com duas estações: a chuvosa (janeiro a junho), com precipitação pluviométrica média de 1.954 mm; e a de estiagem (julho a dezembro). A temperatura varia entre 28 a 30°C, em média<sup>9</sup>.

Foram selecionados aleatoriamente dois distritos do município de São Luís e em cada um destes, sorteados quatro bairros, totalizando oito bairros: Distrito Centro – Coréia de Baixo, Lira, Goiabal e João Paulo; e Distrito Cohab

– Itapiracó, Residencial Canudos, Conjunto Cohatrac I e Vila Luisão. As coletas foram realizadas em quatro quarteirões e dez imóveis por quarteirão, perfazendo um total de 32 quarteirões e 320 imóveis visitados. As visitas foram feitas juntamente com supervisores e agentes de controle do dengue da Secretaria Municipal de Saúde de São Luís.

### Coleta dos Alados

As coletas foram realizadas em três períodos: seco (novembro e dezembro de 2008), chuvoso (março e abril de 2009) e intermediário, caracterizando o término do chuvoso e início do seco (julho e agosto de 2009). A captura dos alados foi feita utilizando-se aspirador mecânico segundo Nasci<sup>10</sup> (1981). Os espécimes foram anestesiados com acetato de etila e transportados ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, para realização da identificação usando as chaves de identificação de Forattini<sup>11</sup> (2002) e posterior armazenamento em freezer a – 86° C.

### Detecção e sorotipagem do vírus dengue (VDEN)

Os espécimes coletados foram encaminhados ao Laboratório de Entomologia onde foi feita a confirmação da identificação dos exemplares e aos Laboratórios de Cultura de Células e Biologia Molecular para tentativa de isolamento viral e realização da RT-PCR, da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, do Instituto Evandro Chagas, em Ananindeua, Pará.

Os espécimes de *Aedes aegypti* foram divididos em lotes que continham de 1 a 37 mosquitos e foram macerados em solução de PBS (tampão salino fosfato pH 7,4) contendo albumina bovina a 0,75%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), de acordo com o Protocolo de Reynes (1995)<sup>12</sup>.

O sobrenadante foi filtrado para ser utilizado na extração de RNA e isolamento viral. As suspensões de mosquitos adultos foram inoculadas em cultura de células de *Aedes albopictus*, linhagem C6/36 (American Type Culture Cell Collection/ATCC), e observadas para verificação de efeito

citopatogênico (ECP) durante 14 dias e analisadas quanto à presença do VDEN por imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpos monoclonais. O método utilizado foi o descrito previamente por Gubler et al.<sup>13</sup> (1984)..

. O método de extração de RNA usado foi o do reagente Trizol LS (Invitrogen/San Diego/USA), seguindo orientações do fabricante. O RNA extraído foi eluído em água livre de RNase. O teste de RT-Semi-Nested-PCR de acordo com Lanciotti et al.<sup>14</sup> (1992), inclui o gene proteína prM/M. A reação foi feita em duas etapas, iniciando com a síntese de cDNA a partir de RNA viral extraído<sup>14</sup>.

### Análise estatística

Para examinar diferenças entre os períodos e bairros de coleta, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no software System Analysis Statistical<sup>15</sup> (2001).

## **RESULTADOS**

Foram coletados 563 mosquitos *Aedes aegypti*, sendo 368 fêmeas (65,37%) e 195 machos (34,63%). Quanto à distribuição de alados por período, 141 foram coletados no período seco, 272 no chuvoso e 150 no intermediário. O período chuvoso foi o mais produtivo com 48,32% dos mosquitos coletados e o seco o menos, com 25,04% (Tabela 1), no entanto os testes estatísticos do número de espécimes em relação aos períodos de coleta, não mostraram diferença significativa ( $p = 0,1965$ ).

Os espécimes foram coletados nos bairros previamente sorteados nos distritos Centro e Cohab. A quantidade de alados variou significativamente entre os bairros, sendo o João Paulo e o Goiabal os que apresentaram as densidades mais elevadas considerando-se o total de espécimes coletados nos três períodos ( $p = 0,0094$ ) (Tabela 2). Em relação aos períodos de coleta, no período seco, o bairro João Paulo (Distrito Centro) apresentou maior percentual de alados, com 39,75%, (56 exemplares), sendo seguido pelo Vila Luisão (Distrito Cohab) com 14,89% (21 espécimes). No período chuvoso, o bairro com maior quantidade de espécimes coletados também foi o João Paulo, com

84 exemplares, o equivalente a 30,91%. O segundo com maior densidade de alados de *Aedes aegypti* no mesmo período foi o Lira com 21,32% (58 exemplares). Em relação ao período intermediário, os bairros com maior quantidade de espécimes coletados foram o Goiabal (Distrito Centro) com 33,35% (50 exemplares) e novamente o João Paulo com 23,33% (35 alados).

Os exemplares de *Aedes aegypti* foram divididos em lotes que continham de 1 a 37 mosquitos para as análises moleculares, considerando-se os bairros de coleta. O número de lotes diferiu em cada período: 13 no seco, 23 no chuvoso e 15 no intermediário. Foi realizado o isolamento viral em todos os lotes, porém não foi constatada positividade para os vírus dengue. Também se utilizou a RT-PCR para detecção do vírus dengue em todas as amostras. Não se encontrou positividade em nenhum dos lotes.

## DISCUSSÃO

Os espécimes de *Aedes aegypti* coletados foram analisados para detecção e identificação dos sorotipos do dengue circulantes utilizando técnicas de isolamento viral e análise molecular por RT-PCR. No entanto, não se registrou positividade em nenhum dos lotes de mosquitos. Este resultado deve estar relacionado pela redução acentuada de notificações da doença no município de São Luís, durante o período de estudo. Houve uma baixa endemicidade no ano de 2008, quando comparado a 2007, e esta situação se repetiu devendo-se destacar que de janeiro a junho de 2009, não houve registro de isolamento de VDEN no Estado<sup>5</sup>, o que atesta a baixa circulação viral, em comparação ao ano anterior em que se notificou 5.699 casos de dengue notificados no mesmo período<sup>4</sup>.

No Maranhão, na cidade de Caxias e em São Luís Lucena et al.<sup>16</sup> (2008) realizaram coletas de *Aedes aegypti* e detectaram a circulação de dois sorotipos do dengue, o VDEN2 e o VDEN3, respectivamente. Os bairros com positividade em Caxias foram Castelo Branco e Cangalheiro, e em São Luís, Pirapora. Os resultados do referido trabalho foram corroborados pelos exames positivos de pacientes diagnosticados com dengue, confirmando a circulação dos sorotipos nas duas cidades. Deve-se enfatizar que essas coletas foram direcionadas aos bairros com ocorrência de casos de dengue em humanos<sup>16</sup>.

O isolamento viral e a RT-PCR são alternativas para se conhecer as taxas de infecção em vetores e monitorar a introdução de novos sorotipos em áreas com circulação prévia de outros sorotipos<sup>7</sup>. Pinheiro et al.<sup>17</sup> (2005) em estudo feito na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, encontraram o sorotipo VDEN3 em 15 grupos de fêmeas de *Aedes aegypti* no período anterior a maior ocorrência de casos de dengue. Em Porto Triunfo, na Colômbia, Romero-Vivas et al.<sup>18</sup> (2000) isolaram os sorotipos VDEN1 e VDEN2 em fêmeas de *Aedes aegypti*. Outros estudos também têm demonstrado a importância do isolamento de vírus dengue em mosquitos antes da disseminação do agente etiológico para a população humana<sup>19,20</sup>.

Estudos utilizando fêmeas adultas coletadas no campo, obtiveram altas taxas de infecção, como os 8,52% detectados por Lourenço-de-Oliveira et al.<sup>21</sup> (2002) no Rio de Janeiro, e 16% detectados por Urdaneta et al.<sup>7</sup> (2005), que coletaram adultos de *Aedes aegypti* em casas de pessoas infectadas na Venezuela. Kow et al.<sup>22</sup> (2001), encontraram uma taxa de 0,133% ao isolar vírus dengue de machos adultos de *Aedes aegypti* coletados no campo. Estes resultados sugerem que a transmissão transovariana do vírus dengue em *Aedes aegypti* pode ocorrer com uma frequência muito baixa na natureza, e seu papel na persistência viral em áreas urbanas pode não ser muito extensa<sup>6</sup>.

Zeidler et al.<sup>6</sup> (2008) em tentativa de isolamento de vírus dengue em 44 lotes de larvas de *Aedes aegypti*, coletadas em um bairro com alta incidência de dengue e alta infestação do vetor, na cidade de Boa Vista, Estado de Roraima, também não conseguiram detectar positividade nas amostras. O método para triagem de vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* não é o mais adequado para predição de epidemias, dada a sua baixa taxa de infecção quando comparada com a seleção de fêmeas adultas. Isto pode estar relacionada ao fato de que as fêmeas, que necessitam de repastos sanguíneos, têm muito mais probabilidade de se infectar com vírus dengue<sup>6</sup>.

No entanto, no Brasil, ainda existem poucos estudos voltados para a detecção viral do dengue em mosquitos<sup>23</sup>. Muitas pesquisas se restringem a apenas analisar dados epidemiológicos, por meio da coleta de soro de pacientes quando a epidemia já está estabelecida.

Para Pinheiro et al.<sup>17</sup> (2005) a investigação das taxas de infecção em mosquitos fornece informações sobre o sorotipo circulante numa localidade,

antes que a doença seja transmitida em níveis elevados, possibilitando a implementação de medidas preventivas evitando assim epidemias de grandes proporções.

Em conclusão, a realização de análises de mosquitos pode dar respostas sobre o período de início da circulação viral e também em que períodos do ano há intensificação da presença dos vírus dengue, o que permite o combate ao vetor de forma antecipada à ocorrência de casos de dengue na população. Sugere-se, portanto, a realização da pesquisa de alados em um período de tempo mais prolongado, ininterruptamente e de forma simultânea em diferentes áreas de uma localidade, para aumentar as chances do encontro de espécimes infectados. O conhecimento do sorotipo que está circulando é uma informação fundamental para alertar a população da possibilidade de ocorrência de formas mais graves da doença.

### **Agradecimentos**

Ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão pelo armazenamento dos espécimes após a identificação. À Secretaria Municipal de Saúde de São Luís pela disponibilização dos agentes de controle do dengue e do transporte para deslocamento aos bairros. Ao Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão pelo fornecimento dos dados climatológicos.

### **REFERÊNCIAS**

1. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Pública* 2001; 17:99-102.
2. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006. *Boletim Situação Epidemiológica da Dengue até Outubro de 2006 (semana epidemiológica Nº. 42)*. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 15 de nov. de 2007.
3. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2007. *Dengue – Balanço Dengue Janeiro a Julho de 2007*. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 15 de nov. de 2007.

4. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. *Casos de dengue registrados no município de São Luís, Maranhão*. 2008. Disponível em: <<http://www.saude.ma.gov.br>>. Acessado em: 13 de fev. de 2008.
5. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. *Informe Epidemiológico 17/2009*. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 10 de set. de 2009.
6. Zeidler JD, Acosta POA, Barrêto PP, Cordeiro JS. Dengue virus in *Aedes aegypti* and infestation dynamics in Roraima, Brazil. *Rev de Saúde Pública* 2008; 42:1-6.
7. Urdaneta L, Herrera F, Pernalet M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect Gen Evol* 2005; 5:177-84.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE-Cidades. *Município de São Luís, Maranhão*. 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acessado em: 28 de mar. de 2008.
9. Gerência de Planejamento do Estado do Maranhão. *Atlas do Maranhão*. GEPLAN, São Luís, 2002.
10. Nasci RS. A light weight battery-powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. *Mosq News* 1981;41:808-11.
11. Forattini OP. *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
12. Reynes JM. Tentatives d'isolement d'arbovirus a partir de serum ou surnageants de moustiques sur cellules APG1. *Inst Pasteur Guyane* 1995.
13. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:9-13.
14. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-551.
15. Statsoft, 2001. *Statistica (data analysis software system)*, version 6. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>.
16. Lucena MA, Tadei WP, Cruz ACR, Pinheiro VCS. 2008. Detecção dos sorotipos do vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) no município de São Luís, Estado do Maranhão com a técnica da Transcriptase Reversa –

Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). *Anais do 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41:161.

17. Pinheiro VCS, Tadei WP, Barros PMSS, Vasconcelos PFC, Cruz ACR. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:833-839.

18. Romero-Vivas CME, Sutherland CJ, Falconar AKI. The use of direct sequencing of dengue virus cDNA from individual field-collected *Aedes aegypti* for surveillance and epidemiological studies. *J Med Entomol* 2000; 14:89-94.

19. Cao-Lormeau V. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology* 2009; 6:1-4.

20. Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AWE, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J et al. Dengue Virus Type 2 Infections of *Aedes aegypti* are Modulated by the Mosquito's RNA Interference Pathway. *PLoS Pathog* 2009; 5:1-11.

21. Lourenço de Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:799-800.

22. Kow CY, Koon LL, Yin PF. Detection of Dengue Viruses in Field Caught Male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by Type-Specific PCR. *J Med Entomol* 2001; 38:475-479

23. Figueiredo LTM. Dengue in Brazil: past, present and future perspective. *Dengue Bull* 2003; 27:25-33.

Tabela 1. Percentual de exemplares de *A. aegypti* coletados nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão.

<i>Mosquitos A. aegypti</i>			
Período	Fêmeas (♀)	Machos (♂)	Total
Seco	94	47	141 (25,04%)
Chuvoso	182	90	272 (48,32%)
Intermediário	92	58	150 (26,64%)
Total	368 (65,37%)	195 (34,63%)	563 (100,00%)
Teste Kruskal-Wallis = 3,253983; p = 0,1965			

Tabela 2. Número de alados coletados por período em bairros de São Luís, Maranhão, 2008-2009.

Bairros	Número de alados (%)			Total
	Período Seco	Período Chuvoso	Período Intermediário	
	Nov. e Dez. / 2008	Mar. e Abr. / 2009	Jul. e Ago. / 2009	
Coréia de Baixo	3 (2,12)	21 (7,72)	12 (8,00)	36 (6,39)
Lira	6 (4,25)	58 (21,32)	21 (14,00)	85 (15,09)
Goiabal	39 (27,66)	42 (15,44)	50 (33,35)	131 (23,26)*
João Paulo	56 (39,75)	84 (30,91)	35 (23,33)	175 (31,13)*
Itapiracó	8 (5,67)	12 (4,41)	10 (6,66)	30 (5,32)
Residencial Canudos	4 (2,83)	5 (1,83)	5 (3,33)	14 (2,48)
Conjunto Cohatrac I	4 (2,83)	36 (13,23)	3 (2,00)	43 (7,63)
Vila Luisão	21 (14,89)	14 (5,14)	14 (9,33)	49 (8,70)
Total	141 (100,00)	272 (100,00)	150 (100,00)	563 (100,00)

Teste Kruskal-Wallis = 18,63852;  $p = 0,0094$

Significativo a nível de 5%.

Tabela 3. Resultados das análises moleculares por Isolamento Viral e RT-PCR em mosquitos *Aedes aegypti* coletados por período em bairros de São Luís, Maranhão, 2008-2009.

Período	Número de pools	Resultado do Isolamento Viral	Resultado da RT-PCR
Seco	13	Negativo	Negativo
Chuvoso	23	Negativo	Negativo
Intermediário	15	Negativo	Negativo

## 2 Apêndice 2

### 2.1 Segundo Artigo Científico

#### 2.1.1 Classificação do Qualis do Periódico na área de Medicina II:

ISSN	Título	Estrato	Área de Avaliação
0001-706X	Acta Tropica	B1	MEDICINA II

#### 2.1.2 Normas Editoriais:

Acta Tropica publica artigos originais, comunicações breves e artigos de revisão. Trabalhos originais normalmente não devem exceder 10 páginas impressas, incluindo tabelas e figuras. Comunicações curtas não deve exceder 4 páginas impressas, incluindo tabelas e figuras. Os manuscritos devem ser acompanhados de uma carta assinada por todos os autores. A apresentação de um artigo para a Acta Tropica é entendida como implicando que não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo), e que não está sendo considerado para publicação em outro lugar. O ato de submeter um manuscrito para Acta Tropica carrega com ele o direito de publicar no jornal. A responsabilidade pela veracidade do material do manuscrito, incluindo referências bibliográficas, encontra-se inteiramente com os autores.

**Apresentação.** A submissão a este jornal continua totalmente on-line, e você será guiado passo a passo, através do upload de seus arquivos. O sistema automaticamente converte arquivos de origem para um único arquivo PDF do artigo, que é usado no processo de revisão. Por favor, note que, apesar de arquivos de origem do manuscrito serem convertidos para arquivos PDF em apresentação para o processo de revisão, esses arquivos de origem são necessários para o processamento adicional após a aceitação.

**Âmbito do Jornal.** O conteúdo dos artigos submetidos deve cair dentro do escopo da revista. Manuscritos baseados em parasitas / micróbios ou experiências para inibição de vetores com extratos ou frações, onde os ingredientes ativos não são definidos, normalmente não serão aceitos. Os documentos originais deverão ser

organizados da seguinte forma: Resumo – Palavras-chave – Introdução – Material (ou Pacientes) e Métodos – Resultados – Discussões – Agradecimentos – Referências.

(a) Os trabalhos devem ser completos em todos os aspectos, com espaçamento duplo e mesmas margens de largura. O sistema métrico é para ser usado por toda parte.

(b) Os originais devem ser cuidadosamente verificados antes do envio. Nenhuma alteração será permitida na fase da prova.

(c) O título da página deve incluir: título, nomes, filiações e endereço postal completo de todos os autores. Um autor correspondente deve ser designado, com telefone e endereço de e-mail.

(d) Um resumo, não superior a 5% do comprimento do artigo, deve ser fornecido.

(e) Palavras-chave (termos de indexação), normalmente 3-6 itens, devem ser fornecidos.

As referências devem ser reunidas em ordem alfabética em uma folha separada. No texto devem ser referidas pelo nome e ano (Sistema de Harvard), o ano deve ser colocado entre parênteses, por exemplo, (Jones, 1970). Mais do que um artigo do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificados pelas letras A, B, C, etc, colocado após o ano de publicação. No texto, quando se refere a um trabalho de mais de dois autores, o nome do primeiro autor deve ser seguido de et al. Referências bibliográficas devem consistir em nomes e iniciais de todos os autores, ano, título do documento referido, o título abreviado do periódico, número do volume e da primeira e última páginas do jornal. Periódicos, livros e vários livros do autor deve estar em conformidade com os seguintes exemplos:

- Musaka, RA, Nayambati, VM, Nantulya, VM, Majiwa, PAO, Mooloo, SK, Musoke, AJ, 1988. Os perfis de cromossomo Trypanosoma congolense isolados de Kilifi, Quênia e sua relação com a serodema identidade. Mol. Biochem. Parasitol. 30, 105-112.

- Garcia, L.S., Bruckner, D.A., 1988. Diagnostic Medical Parasitology. Histológica identificação dos parasitas. Elsevier Sci. Publ. Co. Inc., New York, NY, pp. 326-334.

- Scorza, JV, Medina, R., Pérez, H., Hernandez, AG, 1985. Leishmaniose na Venezuela. In: K.-P. Chang e R.S. Bray (Eds.), Human Doenças Parasitárias, vol. 1, leishmaniose, Elsevier, Amsterdam, pp. 283-296.

- Títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com theList de Serial Title Word Abbreviations (disponível a partir International Serials Data System, 20 rue

Bachumont, 75002 Paris, França. ISBN 2-904938-02-8). Referências relativas a dados não publicados não devem ser citados na lista de referência; trabalhos aceitos para publicação devem ser referidos como na imprensa. Referências incompleta pode resultar em atraso da publicação.

### 2.1.3 Artigo Completo:

**Variação sazonal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no município de São Luís, Maranhão, Brasil.**

**Seasonal variation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in São Luís, Maranhão, Brazil.**

Juliana Maria Trindade Bezerra<sup>1</sup>

Jivanildo Pinheiro Miranda<sup>2</sup>

Joaquim Pinto Nunes Neto<sup>3</sup>

Ana Cecília Ribeiro Cruz<sup>3</sup>

Wanderli Pedro Tadei<sup>4</sup>

Valéria Cristina Soares Pinheiro<sup>5</sup>

1. Programa de Pós Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão – Mestrado Acadêmico. A correspondência deve ser dirigida a: Juliana Maria Trindade Bezerra. Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Entomologia Médica, Universidade Estadual do Maranhão – Centro de Estudos Superiores de Caxias. Praça Duque de Caxias s/n Morro do Alecrim, Caxias – MA, 65600-000, Brasil. E-mails: [jmt\\_bezerra@hotmail.com](mailto:jmt_bezerra@hotmail.com); [valeria@cesc.uema.br](mailto:valeria@cesc.uema.br).

2. Universidade Federal do Maranhão – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais. Rodovia BR-222 km 74 s/n Boa Vista, Chapadinha – MA, 65500-000, Brasil.

3. Instituto Evandro Chagas – Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas. Rodovia BR-316 km 7 s/n Levilândia, Ananindeua – PA, 67030-000, Brasil.

4. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Laboratório de Malária e Dengue. Avenida André Araújo 2936 Aleixo, Manaus – AM, 69060-001, Brasil.

5. Universidade Estadual do Maranhão – Centro de Estudos Superiores de Caxias. Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Entomologia Médica, Universidade Estadual do Maranhão – Centro de Estudos Superiores de Caxias. Praça Duque de Caxias s/n Morro do Alecrim, Caxias – MA, 65600-000, Brasil.

**Resumo:** Este estudo objetivou estimar a densidade populacional sazonal do *Aedes aegypti* em bairros do município de São Luís, Estado do Maranhão, e analisar a influência da temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica na distribuição dessa espécie. Foram visitados 320 imóveis em oito bairros previamente sorteados do município: Coréia de Baixo, Lira, Goiabal, João Paulo, Itapiracó, Residencial Canudos, Conjunto Cohatrac I e Vila Luisão. As coletas foram realizadas em três períodos: seco (novembro e dezembro de 2008), chuvoso (março e abril de 2009) e intermediário (julho e agosto de 2009), nos turnos matutino (08h00 às 12h00) e vespertino (14h00 às 18h00). Foram coletados 563 mosquitos *Aedes aegypti*, sendo 141 no seco, 272 no chuvoso e 150 no intermediário. O período chuvoso foi considerado o mais produtivo em número de mosquitos, sendo no mês de março coletada a maior quantidade de alados, com 173 espécimes. A análise da quantidade de adultos de *Aedes aegypti* em relação aos períodos ( $p = 0,1965$ ) e meses ( $p = 0,2423$ ) de coleta, não mostrou diferenças significantes. Os testes mostraram que a quantidade de alados variou significativamente entre os bairros, sendo o João Paulo e o Goiabal, localizados na Zona Central de São Luís, os que apresentaram as densidades mais elevadas considerando-se o total de espécimes coletados nos três períodos ( $p = 0,0094$ ). Os dados expostos neste trabalho demonstram que em São Luís, os fatores climáticos apesar de influenciarem o desenvolvimento do *Aedes aegypti* não foram apontados como os principais responsáveis pela flutuação sazonal desse vetor, o que deve estar relacionado a fatores sociais, culturais e outros fatores como a concentração populacional e problemas de saneamento.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*, sazonalidade, densidade populacional.

**Abstract:** This study aimed to estimate the seasonal population density of *Aedes aegypti* in districts of São Luís, Maranhão, and to analyze the influence of temperature, relative humidity and rainfall distribution of this species. 320 properties were visited in eight districts previously drawn of the city: “Coréia de Baixo”, “Lira”, “Goiabal”, “João Paulo”, “Itapiracó”, “Residencial Canudos”, “Conjunto Cohatrac I” and “Vila Luisão”. Samples were collected in three periods: dry (November-December 2008), rainy (March-April 2009) and intermediate (July / August 2009), shifts in the morning (08h00 to 12h00) and afternoon (14h00 to 18h00). We collected 563 mosquitoes *Aedes aegypti*, with 141 in the dry season, 272 in the rainy and 150 in the intermediate. The rainy

season was considered the most productive in the number of mosquitoes, and in March collected the largest amount of winged, with 173 specimens. The analysis of the number of *Aedes aegypti* adults in relation to periods ( $p = 0.1965$ ) and months ( $p = 0.2423$ ) collection, showed no significant differences. Tests showed that the quantity of winged varied significantly between districts, and the “João Paulo” and “Goiabal”, located in the Central Zone of São Luís who had higher densities considering the total of specimens collected in three periods ( $p = 0.0094$ ). The data presented in this paper show that in São Luís despite the climatic factors influence the development of *Aedes aegypti* were not indicated as the main responsible for the seasonal fluctuation of this vector, which should be related to social, cultural and other factors such as population density and poor sanitation.

## **Introdução**

O *Aedes aegypti* é o principal vetor do Dengue Clássico (DC) e da Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) nas Américas (Forattini, 2002). A prevenção de epidemias do dengue depende fundamentalmente da redução populacional do vetor no domicílio e peridomicílio – principais locais nos quais ocorre a transmissão (Tauil, 2002). Aliado a isso, a eliminação dos recipientes que acumulam água e servem de habitat para as larvas do *Aedes aegypti* se constitui no modo mais efetivo de reduzir sua reprodução e dispersão nos centros urbanos brasileiros, em especial nos municípios da Região Nordeste do país, que apresentam deficiência nos sistemas de abastecimento (Gubler, 2002; Caprara et al., 2009).

A expansão geográfica de populações de *Aedes aegypti* sofre influência de vários fatores, dentre os quais estão os climáticos (Glasser e Gomes, 2002). A precipitação pluviométrica é um fator importante na abundância de *Aedes aegypti*, a qual influi principalmente na densidade de criadouros devido ao aumento de recipientes artificiais e naturais com acúmulo de água no extradomicílio, nos períodos e locais com mais frequência e intensidade de chuva (Costa et al., 2008). Além disso, são cada vez maiores as evidências de que a ampliação das áreas de disseminação do vetor, e conseqüente transmissão da doença, deve-se ao aumento da temperatura do planeta, especialmente nos últimos 100 anos (Hurtado-Díaz et al., 2007).

No Estado do Maranhão, o *Aedes aegypti* foi introduzido em 1969, mas só chamou a atenção dos órgãos de saúde pública no ano de 1995, quando se detectaram os

primeiros casos de DC. No município de São Luís verifica-se alta densidade de imóveis infestados, o que se deve, entre outros fatores, à grande concentração populacional em aglomerados de habitações sem saneamento básico na periferia da capital (Rebêlo et al., 1999). É possível observar acúmulo de lixo nos quintais das residências e em terrenos baldios, especialmente em áreas de ocupação irregular com condições de vida mais desfavoráveis onde é limitado o alcance das políticas públicas de saneamento (Gonçalves Neto et al., 2006).

Esta situação favorece a manutenção do vetor, além da circulação simultânea de vários sorotipos do dengue no município, o que propicia a ocorrência de casos de dengue. Em 2008, foram notificados 1.256 casos suspeitos em São Luís, sendo 608 confirmados para o DC e 82 para a FHD (SINAN, 2008). Em 2009, até junho houve redução acentuada das notificações, com o registro de apenas três casos de FHD e nenhum óbito (MS, 2009). No entanto, considerando-se a curva epidemiológica do dengue, as medidas de controle tornaram-se constantes para evitar ou minimizar os casos anualmente.

Dessa forma, considerando a importância das condições climáticas na dispersão das populações de *Aedes aegypti* e a localização do município de São Luís numa área de transição geográfica, o presente trabalho objetivou estimar a densidade populacional do vetor em bairros do município nos diferentes períodos do ano, e analisar a influência da temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica na distribuição dessa espécie.

## **Material e Métodos**

A pesquisa foi realizada no município de São Luís, situado na Ilha de São Luís, ao norte do Estado do Maranhão (02° 31' 47" Sul e 44° 18' 10" Oeste), altitude de 24,391 m e área de 827 Km<sup>2</sup> que corresponde aproximadamente a 0,24% do território do Estado, e com população de 957.515 habitantes (IBGE-Cid@des, 2008). O clima é tropical quente e úmido, com duas estações: a chuvosa (janeiro a junho), com precipitação pluviométrica média de 1.954 mm; e a de estiagem (julho a dezembro). A temperatura varia entre 28 a 30°C, em média (GEPLAN, 2002).

Foram selecionados aleatoriamente dois distritos do município de São Luís e em cada um destes, sorteados quatro bairros, totalizando oito bairros: Distrito Centro – Coréia de Baixo, Lira, Goiabal e João Paulo; e Distrito Cohab – Itapiracó, Residencial Canudos, Conjunto Cohatrac I e Vila Luisão. As coletas foram realizadas em 320

imóveis, sendo visitados 40 por bairro. As visitas foram feitas juntamente com supervisores e agentes de controle do dengue da Secretaria Municipal de Saúde de São Luís.

O Distrito Centro localizado na área central do município, caracteriza-se por apresentar casarões antigos, alguns inclusive abandonados, com bairros possuindo esgoto a céu aberto ou mesmo córregos próximos às residências, o que favorece o acúmulo de lixo jogado pela população. O Distrito Cohab, situado mais à periferia do município compreende uma área com extensa vegetação, o que contribui para a criação de insetos, e nos bairros algumas ruas não possuem asfaltamento, além de apresentarem sistema de saneamento básico deficiente.

As coletas foram realizadas em três períodos: seco (novembro e dezembro de 2008), chuvoso (março e abril de 2009) e intermediário, caracterizando o término do chuvoso e início do seco (julho e agosto de 2009). A captura dos alados foi feita utilizando-se aspirador mecânico acoplado a uma bateria de 12 volts (Nasci, 1981) movimentado embaixo dos móveis e nas partes mais elevadas dos imóveis para aspiração dos mosquitos que estivessem em repouso tanto no intradomicílio quanto no peridomicílio. Os espécimes foram anestesiados e transportados ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, para realização da identificação em nível de espécie, com chaves de identificação de Forattini (2002) e posterior armazenamento em freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$ .

Para o tratamento estatístico, foram utilizados os dados da quantidade de alados coletados por bairro, mês e período (seco, chuvoso e intermediário), bem como os climáticos (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica). Para examinar diferenças entre os períodos de coleta foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis, e para examinar as relações entre quantidade de mosquitos adultos e dados climáticos, foi utilizada a Correlação de Spearman. O nível de significância adotado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no software System Analysis Statistical (Statsoft, 2001).

## **Resultados**

Foram coletados 563 mosquitos *Aedes aegypti*, em oito bairros do município de São Luís, nos três períodos de realização da pesquisa: 141 no seco (novembro e dezembro de 2008), 272 no chuvoso (março e abril de 2009) e 150 no intermediário

(julho e agosto de 2009). Do total de alados, 368 eram fêmeas (65,37%) e 195 (34,63%) eram machos. O período chuvoso foi o mais produtivo em número de mosquitos e no mês de março foi coletada a maior quantidade de alados, com 30,75% (173 espécimes) (Tabela 1). No entanto, a análise da quantidade de adultos de *Aedes aegypti* em relação aos períodos ( $p = 0,1965$ ) e meses ( $p = 0,2423$ ) de coleta, não mostrou diferenças significantes.

A pesquisa revelou que o mês com maior índice acumulado de chuvas foi abril de 2009, alcançando o registro de 537,6 mm, sendo este o que apresentava o segundo maior número de alados (17,58%). Registrou a temperatura média máxima, o mês de novembro de 2008, com 32,88 °C, sendo o mês mais quente, e também foi o período sem ocorrência de chuvas. Neste mês foram coletados 15,63% dos espécimes. Em relação à umidade relativa do ar, observou-se o maior registro médio mensal no mês de julho de 2009, quando foram coletados 93 alados (Tabela 1).

Os resultados da correlação entre a quantidade de exemplares de *Aedes aegypti* e variáveis climáticas encontram-se na Tabela 2. Em relação aos fatores abióticos (médias de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) e o número de alados não foi observada correlação positiva e negativa. Os maiores valores de Correlação de Spearman referiram-se à associação entre número total de alados e a umidade relativa do ar média mensal, e número total de alados e a umidade relativa do ar média mensal mínima com 0,771429 ( $p = 0,072397$ ). A Correlação de Spearman mostrou menor valor de associação, em relação a número de alados e temperatura média mensal mínima, com - 0,771429 ( $p = 0,072397$ ).

Os espécimes foram coletados nos bairros previamente sorteados nos distritos Centro e Cohab. A quantidade de alados variou significativamente entre os bairros, sendo o João Paulo e o Goiabal os que apresentaram as densidades mais elevadas considerando-se o total de espécimes coletados nos três períodos ( $p = 0,0094$ ). Em relação aos períodos de coleta, no período seco, o bairro João Paulo (Distrito Centro) apresentou maior percentual de alados, com 39,75%, (56 exemplares), sendo seguido pelo Vila Luisão (Distrito Cohab) com 14,89% (21 espécimes). No período chuvoso, o bairro com maior quantidade de espécimes coletados também foi o João Paulo, com 84 exemplares, o equivalente a 30,91%. O segundo com maior densidade de alados de *Aedes aegypti* no mesmo período foi o Lira com 21,32% (58 exemplares). Em relação ao período intermediário, os bairros com maior quantidade de espécimes coletados

foram o Goiabal (Distrito Centro) com 33,35% (50 exemplares) e novamente o João Paulo com 23,33% (35 alados) (Tabela 3).

## Discussão

A abundância de populações de mosquitos *Aedes aegypti* pode sofrer influência de fatores bióticos e abióticos, potencialmente envolvidos com flutuações das populações. No presente trabalho, foram realizadas coletas de *Aedes aegypti* em três períodos: seco, chuvoso e intermediário, obtendo-se um total de 563 mosquitos, sendo que a maioria dos espécimes foi coletada no período chuvoso. Os resultados de correlação entre quantidade de exemplares de *Aedes aegypti* e variáveis climáticas não mostrou associação entre os fatores abióticos (médias de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) e número de alados em cada estação e mês de coleta. No entanto, observou-se variação no número de exemplares coletados, com 141 no período seco, 272 no chuvoso e 150 no período intermediário. Esse resultado mostra que os fatores climáticos podem influenciar na densidade de mosquitos nos diferentes períodos do ano, com aumento do número de espécies na época das chuvas.

Estudos têm mostrado associações entre a variação sazonal e a densidade de mosquitos do gênero *Aedes*. Serpa et al. (2006) constataram no município de Potim, São Paulo, a associação entre o *Aedes aegypti* e temperatura máxima, e entre *Aedes albopictus* e pluviosidade. Na pesquisa realizada por Glasser e Gomes (2002) para identificar a influência de fatores climáticos e a distribuição das populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Estado de São Paulo, observou-se a influência dos índices pluviométricos nos padrões de expansão geográfica somente para o *Aedes aegypti*.

No presente estudo observou-se uma densidade significativamente elevada de alados de *Aedes aegypti* nos bairros João Paulo e Goiabal. Estes bairros estão situados no Distrito Centro e apresentam saneamento básico deficiente e esgoto a céu aberto. O João Paulo é um dos bairros mais populosos de São Luís, e apresenta muitos estabelecimentos comerciais e feiras, o que certamente propicia grande quantidade de criadouros para o *Aedes aegypti*. O Goiabal possui algumas áreas com ampla vegetação, grande parte das ruas é asfaltada e a maioria das casas possui terrenos extensos onde é comum a criação de animais domésticos como galinhas e porcos, locais também considerados estratégicos para o desenvolvimento de vetores.

Nos imóveis do João Paulo e do Goiabal foi comum o encontro de recipientes utilizados para o armazenamento de água, o que também pode favorecer essa infestação. Esse aspecto foi apontado por um estudo realizado na Ilha de São Luís, no qual a alta densidade de imóveis infestados devia-se, entre outros motivos, à grande concentração populacional em habitações aglomeradas sem saneamento básico na periferia da capital, situação ainda observada atualmente (Rêbello et al., 1999). Gonçalves Neto et al. (2006) em estudo na capital maranhense também detectaram que a maioria da população dispõe de água do sistema público, entretanto, a descontinuidade no abastecimento desencadeia a estocagem, já que em muitas ocasiões a água somente chega nas torneiras no período da madrugada, obrigando a população a armazená-la em depósitos de grande porte. Nesse contexto, a caixa d'água como criadouro merece atenção especial, uma vez que é encontrada na maioria das residências como reservatório permanente. Esses depósitos e outros usados para armazenar podem se transformar em locais ideais para a proliferação de mosquitos, favorecendo a manutenção de sua população, mesmo em períodos com baixas precipitações (Forattini e Brito, 2003; Penna, 2003; Caprara et al., 2009). Os achados de Almeida et al. (2009) em pesquisa feita no Rio de Janeiro, também apontam que problemas relacionados ao saneamento básico contribuem decisivamente para o aumento do risco de dengue, devido a constante presença do *Aedes aegypti*.

Entretanto, embora os mecanismos de dispersão passiva de *Aedes aegypti* sejam conhecidos, é importante que se estude a influência de diversos fatores na expansão geográfica de suas populações, para subsidiar a formulação de estratégias de vigilância entomológica (Glasser e Gomes, 2000). Os índices de infestação Predial, de Breteau e de Tipo de Recipiente são ferramentas utilizadas pelos programas de controle do dengue para medir o nível de infestação vetorial, referentes ao Levantamento de Índice Rápido para *Aedes aegypti* – LIRAA (MS, 2007). No entanto, não avaliam a produtividade dos habitats de *Aedes aegypti* e não são considerados seguros e suficientes para mensurar a distribuição e a intensidade dessa infestação (Kuno, 1995).

Quanto ao ambiente do imóvel no qual se encontrou mosquitos em São Luís, a maioria dos alados foi coletada no intradomicílio, o que demonstra o comportamento endofílico e endofágico desse mosquito. O ambiente interno do imóvel com características próprias de temperatura, sombra, locais para repouso, e oferta de sangue humano, mostra-se bastante propício para esse inseto que está adaptado às condições antrópicas. Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado em São José do Rio Preto, São Paulo, que demonstrou que mais de 80% dos adultos de *Aedes aegypti*

coletados estavam no intradomicílio. Essa permanência no intradomicílio diminui a eficácia de uma das medidas de controle químico do vetor, a nebulização e o ultra baixo volume com máquinas acopladas a veículos motorizados. Nesse caso, o inseticida é aspergido de viaturas que circundam os quarteirões, e a entrada do produto no interior das residências é dificultada por barreiras físicas como árvores, portas e janelas fechadas (Barata et al., 2001). Deve-se ressaltar ainda que muitas vezes os agentes de endemias têm dificuldades para inspecionar o ambiente interno das residências, por resistência dos moradores, o que possibilita a permanência do vetor na habitação.

Embora os dados expostos neste trabalho não tenham comprovado a influência dos fatores climáticos temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica isoladamente como responsáveis pela flutuação sazonal deste vetor, deve-se ressaltar que o período de coleta foi restrito a um ano, com amostras para cada estação, sendo ideal, coletas mensais e repetições anuais. As análises mostraram uma tendência ao desenvolvimento do mosquito em períodos do ano com aumento da temperatura e ocorrência de chuvas, pois estes fatores abióticos podem interferir na sua dinâmica populacional potencializando o aumento do número de criadouros e permitindo o crescimento da população do mosquito. Deve-se ressaltar que vários outros fatores precisam ser considerados nos estudos sobre densidade do *Aedes aegypti* como criadouros, imóveis, frequência de aplicação de inseticidas, entre outros, pois são tipos de condições dos fatores que influenciam na densidade populacional do vetor. Além disso, a urbanização não planejada, com a existência de um sistema deficiente de abastecimento de água e de saneamento básico nos bairros de São Luís, tem criado novas oportunidades para reprodução de insetos.

### **Agradecimentos**

Ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão pelo armazenamento dos espécimes após a identificação. À Secretaria Municipal de Saúde de São Luís pela disponibilização dos agentes de controle do dengue e do transporte para deslocamento aos bairros. Ao Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão pelo fornecimento dos dados climatológicos.

## Referências

- Almeida, A. S., Medronho, R. A., Valencia, L. I. O., 2009. Análise espacial da dengue e o contexto socioeconômico no município do Rio de Janeiro, RJ. *Rev. Saúde Pública* 43, 666-673.
- Barata, E. A. M. F., Costa, A. I. P., Chiaravalloti Neto, F., Glasser, C. M., Barata, J. M. S., Natal, D., 2001. População de *Aedes aegypti* (L) em área endêmica de dengue, Sudoeste do Brasil. *Rev. Saúde Pública* 35, 237-242.
- Caprara, A., Lima, J. W. O., Marinho, A. C. P., Calvasina, P. G., Landim, L. P., Sommerfeld, J., 2009. Irregular water supply, household usage and dengue: a bio-social study in the Brazilian Northeast. *Cad. Saúde Pública* 25, 125-136.
- Costa, F. S., Silva, J. J., Souza, C. M., Mendes, J., 2008. Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 309-312.
- Forattini, O. P., 2002. *Culicidologia Médica*, vol. 2, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Forattini, O. P., Brito, M., 2003. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Pública* 37, 676-677.
- GEPLAN, 2002. *Atlas do Maranhão*, GEPLAN, São Luís.
- Glasser, C. M., Gomes, A. C., 2002. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. *Rev. Saúde Pública* 36, 166-172.
- Glasser, C. M., Gomes, A. C., 2000. Infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. *Rev. Saúde Pública* 34. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/scielo>>. Acessado em: 14 de out. de 2009.
- Gonçalves Neto, V. S., Monteiro, S. G., Gonçalves, A. G., Rebêlo, J. M. M. 2006. Conhecimentos e atitudes da população sobre dengue no município de São Luís, Maranhão, Brasil, 2004. *Cad. Saúde Pública*. 22, 2191-2200.
- Gubler, D. J., 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends. Microbiol.* 10, 100-103.
- Hurtado-Díaz, M., Riojas-Rodríguez, H., Rothenberg, S. J., Gomez-Dantés, H., Cifuentes, E., 2007. Impact of climate variability on the incidence of dengue in Mexico. *Trop. Med. Internat. Health* 12, 1327-1337.
- IBGE-Cid@des. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acessado em: 28 de janeiro de 2008.

Kuno, G., 1995. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiol. Reviews* 17, 321-335.

MS, 2009. Informe Epidemiológico 17/2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acessado em: 10 de set. de 2009.

MS, 2007. Resultado do Levantamento de Índice Rápido de Infestação por *Aedes aegypti* – LIRAA 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lira\\_nacional.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lira_nacional.pdf)>. Acessado em: 08 de jan. de 2009.

Nasci, R. S., 1981. A light weight battery-powered aspirator for collecting mosquitoes in the field. *Mosq. News* 41, 808-811.

Penna, M. L. F., 2003. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cad. Saúde Pública* 19, 305-309.

Rebêlo, J. M. M., Costa, J. M. L., Silva, F. S., Pereira, Y. N. O., Silva, J. M., 1999. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 15, 477-486.

Serpa, L. L. N., Costa, K. V. R., Voltolini, J. C., Kakitani, I., 2006. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. *Rev. Saúde Pública*. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v40n6/20.pdf>>.

SINAN, 2008. Casos de dengue registrados no município de São Luís, Maranhão. 2008. Disponível em: <<http://www.saude.ma.gov.br>>. Acessado em: 13 de fev. de 2008.

Statsoft, 2001. Statistica (data analysis software system), version 6. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>.

Tauil, P. L., 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública* 18, 867-871.

Tabela 1. Número de alados de *Aedes aegypti* e informação relativa aos fatores abióticos no município de São Luís, Maranhão, 2008-2009.

Mês / Ano	Número de alados (%)	Precipitação pluviométrica (mm)	Temperatura Média Mensal (°C)		Umidade Relativa do Ar Média Mensal (%)	
			Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
Nov. 2008	/ 88 (15,63)	0	32,88	25,40	82,26	54,06
Dez. 2008	/ 53 (9,41)	40,6	32,05	25,17	88,83	57,03
Mar. 2009	/ 173 (30,75)	442,2	29,90	23,46	97,93	72,45
Abr. 2009	/ 99 (17,58)	537,6	29,24	23,21	98,70	76,16
Jul. / 2009	93 (16,51)	82,4	32,16	22,30	99,41	65,29
Ago. 2009	/ 57 (10,12)	23,2	32,70	23,06	96,70	60,64

Tabela 2. Associação entre quantidade de alados de *Aedes aegypti* e fatores abióticos nos períodos seco, chuvoso e intermediário, em bairros do município de São Luís, Maranhão.

Pares de Variáveis	N	R	t	p-level
Alados x PP	6	0,714286	2,04124	0,110787
Alados x URA Média Mensal	6	0,771429	2,42467	0,072397
Alados x URA Média Mensal Máx.	6	0,6	1,5	0,208
Alados x URA Média Mensal Min.	6	0,771429	2,42467	0,072397
Alados x T Média Mensal	6	-0,2	-0,40825	0,704
Alados x T Média Mensal Máx.	6	-0,542857	-1,29279	0,265703
Alados x T Média Mensal Min.	6	-0,771429	-2,42467	0,072397

PP = Precipitação Pluviométrica; URA = Umidade Relativa do Ar; T = Temperatura; máx. = máxima; min. = mínima; R = Correlação de Spearman.

Fonte: Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão.

Tabela 3. Número de alados coletados por período em bairros de São Luís, Maranhão, 2008-2009.

Bairros	Número de alados (%)			Total
	Período Seco	Período Chuvoso	Período Intermediário	
	Nov. e Dez. / 2008	Mar. e Abr. / 2009	Jul. e Ago. / 2009	
Coréia de Baixo	3 (2,12)	21 (7,72)	12 (8,00)	36 (6,39)
Lira	6 (4,25)	58 (21,32)	21 (14,00)	85 (15,09)
Goiabal	39 (27,66)	42 (15,44)	50 (33,35)	131 (23,26)
João Paulo	56 (39,75)	84 (30,91)	35 (23,33)	175 (31,13)
Itapiracó	8 (5,67)	12 (4,41)	10 (6,66)	30 (5,32)
Residencial Canudos	4 (2,83)	5 (1,83)	5 (3,33)	14 (2,48)
Conjunto Cohatrac I	4 (2,83)	36 (13,23)	3 (2,00)	43 (7,63)
Vila Luisão	21 (14,89)	14 (5,14)	14 (9,33)	49 (8,70)
Total	141 (100,00)	272 (100,00)	150 (100,00)	563 (100,00)