

Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas

Detection and typing of dengue viruses in *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) in the City of Manaus, State of Amazonas

Cristóvão Alves da Costa¹, Ilia Gilmaria Carvalho dos Santos²
e Maria da Graça Barbosa³

RESUMO

O estudo teve por objetivo a detecção e tipagem do vírus dengue, nos vetores *Aedes aegypti*. Durante o período de dezembro de 2005 a dezembro de 2006, foram coletados 8.984 mosquitos, em 46 bairros da Cidade de Manaus abrangendo todas as zonas geográficas da cidade. Destes, 819 eram *Aedes aegypti* (414 fêmeas e 405 machos). As fêmeas de *Aedes aegypti* foram agrupadas em *pools* de 1 a 10 mosquitos totalizando 138 *pools*, sendo que 111 *pools* foram positivos para DENV 3. Porém, um *pool* mostrou-se positivo para dois sorotipos, DENV 1 e DENV 3. A prevalência de *Aedes aegypti* infectados com DENV 3, na Cidade de Manaus foi de 53%. Entretanto, a prevalência por zona foi de 70% no Centro-oeste, 60% no Sul, 53% no Oeste, 47% no Centro-Sul, 30% no Norte e 23% na zona Leste. O monitoramento da circulação viral em mosquitos com o uso da técnica da transcrição reversa-reação da polimerase em cadeia que permite o conhecimento prévio dos níveis de disseminação viral em determinadas áreas contribuindo para determinar os locais para aplicar as medidas de prevenção e controle.

Palavras-chaves: *Aedes aegypti*. Vírus dengue. Transcrição reversa-reação da polimerase em cadeia. Manaus. Brasil.

ABSTRACT

The aim of this study was to detect and type dengue viruses in the vector *Aedes aegypti*. Between December 2005 and December 2006, 8,984 mosquitoes were collected in 46 districts of the city of Manaus, covering all of the geographical zones of the city. Of these, 819 were *Aedes aegypti* (414 females and 405 males). The females of *Aedes aegypti* were grouped in pools of 1 to 10 mosquitoes, thus totaling 138 pools, of which 111 pools were positive for DENV 3 and a single pool was positive for two serotypes (DENV 1 and DENV 3). The prevalence of *Aedes aegypti* infected with DENV 3 in the city of Manaus was 53%. The zonal prevalence was 70% in the western central zone, 60% in the southern zone, 53% in the western zone, 47% in the southern central zone, 30% in the northern zone and 23% in the eastern zone. Monitoring of virus circulation among mosquitoes by means of the reverse transcription polymerase chain reaction technique enables prior knowledge of the levels of virus spread in given areas, thus contributing towards determining the localities where prevention and control measures should be applied.

Key-words: *Aedes aegypti*. Dengue virus. Reverse transcription - polymerase chain reaction. Manaus. Brazil.

A dengue é considerada a arbovirose mais frequente em todo o mundo, constituindo causa importante de morbidade e mortalidade²¹. Estima-se que 2,5 a 3,0 bilhões de pessoas residam em áreas onde existe transmissão dos vírus da dengue e que, a cada ano, ocorram 50 milhões de infecções com 500.000 casos de dengue hemorrágica e 12.000 mortes em todo o mundo⁴. Ocorre

em regiões tropicais e subtropicais, predominantemente em áreas urbanas, suburbanas e agora em áreas rurais também⁸.

Os vírus da dengue pertencem ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*. Apresentam propriedades antigênicas distintas que caracterizam quatro sorotipos denominados vírus dengue 1 (DENV 1), vírus dengue 2 (DENV 2), vírus dengue 3 (DENV 3) e vírus dengue 4 (DENV 4). São transmitidos aos humanos por espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor¹⁴.

O *Aedes aegypti* tem hábitos domésticos, pica durante o dia e tem preferência acentuada por sangue humano²⁵. Este mosquito está adaptado a se reproduzir nos ambientes doméstico, peridoméstico e faz sua oviposição em depósitos artificiais de água.

Na Cidade de Manaus, o *Aedes aegypti* foi encontrado pela primeira vez em novembro de 1996 e em março de 1998 ocorreu a primeira epidemia de dengue, na qual foram detectados

1. Laboratório de Virologia Tropical, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, AM. 2. Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. 3. Laboratório de Entomologia, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, AM.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas.

Endereço para correspondência: Dr. Cristóvão Alves da Costa. Laboratório de Virologia Tropical/CPCS/INPA. Avenida André Araújo 2936, Aleixo, 69060-001 Manaus, AM.

Tel: 55 92 3643-3288; Fax: 55 92 3643-3091

e-mail: crvcosta@inpa.gov.br

Recebido para publicação em 09/03/2009

Aceito em 05/11/2009

os sorotipos DENV 1 e DENV 2¹³. Em 2002, foi isolado pela primeira vez o DENV 3, a partir daí outros casos de DENV 3 foram diagnosticados por isolamento viral¹. Em 2008, foi isolado pela primeira vez o DENV 4 em Manaus¹².

Em Manaus, a urbanização precária com a existência de numerosas invasões de terra e falta de saneamento básico regular associada às condições climáticas de temperatura alta, umidade e índices de chuva são fatores que favorecem a proliferação e dispersão do vetor da dengue¹⁹.

Atualmente, a vigilância virológica para detectar o vírus dengue dentro do mosquito vetor é utilizada, e pode servir como advertência para os sistemas de monitoramento de surtos de dengue prevenindo epidemias. O uso de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), na vigilância virológica do vetor, tem sido intensificado recentemente, permitindo a detecção de mosquitos infectados com o vírus dengue e o seu sorotipo⁹.

O objetivo deste estudo é o conhecimento prévio de áreas com circulação de mosquitos infectados, com determinação do sorotipo (DENV 1 a DENV 4), o que pode contribuir para prover estratégias apropriadas de controle e conseqüentemente na prevenção de surtos e epidemias.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de vetores. Mosquitos foram coletados em 46 bairros da Cidade de Manaus abrangendo todas as zonas geográficas (Leste, Norte, Sul, Oeste, Centro-oeste e Centro-Sul). A captura foi realizada duas vezes por semana iniciando-se pela manhã e terminando no início da tarde, foram utilizados tubos de aspiração por energia de bateria, a coleta foi realizada dentro e ao redor das residências. Os mosquitos eram capturados quando em descanso e voando. Mosquitos foram mortos por congelamento, identificados de acordo com a espécie, agrupados por gêneros, data, bairro agrupados em *pools* de até 10 mosquitos e armazenados a -70°C no mesmo dia da coleta.

Os *pools* foram macerados com gral e pistilo de vidro em tampão de salina fosfato pH 7,4 (PBS), contendo albumina bovina. Uma alíquota do macerado foi utilizada para inóculo em cultura de célula, outra alíquota foi utilizada para extração do ácido ribonucleico (RNA) viral, o restante do macerado foi estocado a -70°C.

Isolamento viral. Foram utilizadas células de *Aedes albopictus*, clone C6/36, em meio de cultura Leibowitz - L15, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais e 10% de solução de triptose fosfato, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomina. Foi utilizado como inóculo 50µL do pool de mosquitos previamente macerados e tratados com uma solução de penicilina-estreptomina. Os tubos com as culturas infectadas foram incubados em estufa a 28°C. As culturas que apresentaram efeito citopático foram submetidas a RT-PCR para confirmação do isolamento e identificação do sorotipo viral.

Extração do ácido ribonucleico viral. O RNA viral foi extraído de *pool* de mosquitos macerados em salina tamponada.

O macerado foi submetido a extração pelo método do Trizol LS Reagent (Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante.

Transcriptase reversa seguida de reação da polimerase em cadeia. A reação de amplificação foi realizada por meio da combinação da transcrição reversa do RNA viral com a subsequente amplificação pela *Taq* polimerase. A reação de amplificação continha os seguintes reagentes: 5,0µL de RNA extraído, 50mM KCl, 20mM de Tris (pH 8.4), 1,5mM MgCl₂, 200µM de cada um dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos, 5mM DTT, 20µM de cada primer (D1 e D2), 1,25U de transcriptase reversa, 1,25U de *Taq* polimerase para um volume final de 50µL de reação. A reação foi incubada em termociclador por 1 hora a 42°C para transcrição reversa, em seguida foi submetida a 35 ciclos térmicos de 94°C por 30s, 55°C por 1min e 72°C por 2min.

Reação de semi-nested de reação da polimerase em cadeia. A segunda amplificação foi realizada com 5µL do material da primeira amplificação diluído 1:100 em água destilada estéril. A reação continha todos os reagentes da primeira amplificação, exceto o primer D2, que foi substituído pelos primers TS1, TS2, TS3 e TS4, o DTT e a transcriptase reversa que foram retirados desta reação. A reação foi submetida a 20 ciclos térmicos de 94°C por 30s, 55°C por 1min e 72°C por 2min. Produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-Edta pH 8,3, com um padrão de 100 pares de bases, corados com brometo de etídio 1% e visualizados por meio de transiluminador de luz ultravioleta.

Os primers específicos usados no presente trabalho têm como região alvo a confluência dos genes C/prM¹⁶.

Para estimar a prevalência de infecção dos mosquitos nas zonas geográficas durante o período do estudo foi utilizado o software *Pool Screen*.

RESULTADOS

Vetores. Foram coletados 8.984. Destes, 819 foram *Aedes aegypti* (414 fêmeas e 405 machos). Somente as fêmeas foram analisadas; estas foram agrupadas em *pools* de 1 a 10 mosquitos/*pools* de acordo com a espécie, sexo, local e data de coleta totalizando 138 *pools*.

Isolamento viral. Todos os 138 *pools* foram inoculados em cultura de célula C6/36 para isolamento viral, sendo que 12 apresentaram suspeita de efeito citopático e destes, 11 tiveram o isolamento de DENV3 confirmados por RT-PCR.

Transcriptase reversa seguida de reação da polimerase em cadeia. Um total de 414 espécimes de *Aedes aegypti* perfazendo 138 *pools* foram testados pela técnica de RT-PCR. Dentre as amostras analisadas, foram identificados 111 *pools* positivos, sendo que todos foram positivos para DENV 3. Apenas um *pool* foi positivo tanto para DENV 2 como para DENV 3 (**Tabela 1**).

Na **Figura 1**, pode-se observar as amostras de DNA submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 1%; a banda de 290 pares de bases corresponde ao DENV 3.

TABELA 1

Resultados da transcriptase reversa - reação da polimerase em cadeia dos pools de mosquitos.

Espécie	Pools processados (n°)	Total de mosquitos n° pools	Pools positivos		Prevalência % (IC)	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4
			n°	%					
<i>Aedes aegypti</i>	138	414	111	80	53% (41,2-65,0)	0	1	111	0
<i>Aedes albopictus</i>	5	7	3	60	50% (62,3-96,0)			3	
Total	143	421	114			1	114		

DEN 1: vírus dengue tipo 1, DEN 2: vírus dengue tipo 2, DEN 3: vírus dengue tipo 3, DEN 4: vírus dengue tipo 4. IC: índice de confiança.

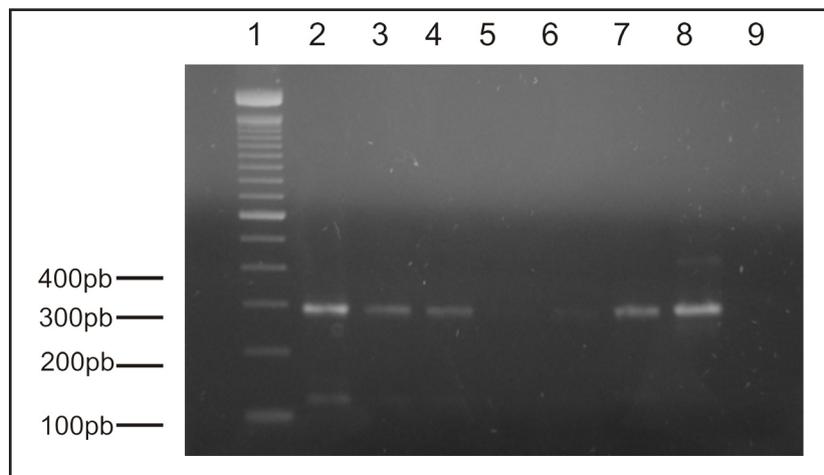


FIGURA 1

Produto da transcrição reversa - reação da polimerase em cadeia em gel de agarose a 1,5%. Canal 1: peso molecular 100 pb. Canal 2: DENV 2 e DENV 3. Canais 3, 4, 7: DENV 3. Canais 5 e 6: negativos. Canal 8: controle positivo DENV 3. Canal 9: controle negativo.

Mosquitos *Aedes aegypti* foram coletados de todas as zonas da Cidade de Manaus e em todas elas também foram encontrados mosquitos infectados. A prevalência de mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV 3 na Cidade de Manaus foi de 53%, sendo maior nas zonas Centro-oeste (70%), Sul (60%) e Oeste (53%), e menor nas zonas Norte (30%) e Leste com (23%) (Tabela 2).

TABELA 2

Prevalência de mosquitos *Aedes aegypti* infectados por zona geográfica da Cidade de Manaus, AM.

Zona de coleta	<i>Aedes aegypti</i>		Prevalência	
	pools positivos	total	%	IC
Norte	17	23	30,0	23,5 – 62,7
Sul	28	31	60,0	47,0 – 92,6
Leste	13	21	23,0	14,2 – 45,1
Oeste	12	15	53,0	32,3 – 86,0
Centro-Oeste	18	20	70,0	46,0 – 96,0
Centro-Sul	23	28	47,0	32,4 – 75,4
Total	111	138		

IC: índice de confiança.

DISCUSSÃO

A transcrição reversa - reação da polimerase em cadeia tem sido utilizada no diagnóstico de diversas doenças e, nos últimos anos, revolucionou o diagnóstico de doenças infecciosas demonstrando ser bastante útil no diagnóstico da dengue. É uma técnica rápida simples e eficiente na identificação e caracterização de arbovírus em investigações epidemiológicas, permite a detecção em uma infinidade de amostras (soro, tecidos de casos fatais, cultura de células, larvas de mosquitos e pools de mosquitos adultos)^{5 15}.

O presente estudo analisou 138 amostras de *Aedes aegypti* pela técnica de RT-PCR, para identificação dos sorotipos do vírus dengue circulantes na Cidade de Manaus durante o período de dezembro de 2005 a dezembro de 2006. Foi encontrada uma prevalência de 53% para o sorotipo 3 do vírus dengue em Manaus. Esse elevado percentual de infecção pelo DENV 3 demonstrou uma importante circulação desse sorotipo na cidade em populações naturais de mosquitos adultos no período de estudo.

Em Manaus, Pinheiro e cols²⁰ analisaram 374 mosquitos *Aedes aegypti*, no ano de 2003; para detecção de vírus dengue, encontraram 18% de positividade para DENV 3. Observou-se, então, um aumento significativo nesta positividade, uma vez que o presente estudo realizado entre 2005 e 2006 encontrou uma positividade de 80% para este mesmo sorotipo.

De fato, segundo o Ministério da Saúde em atividades de monitoramento da circulação viral por meio de sorologia demonstrou a predominância deste sorotipo em todas as regiões do país nos anos de 2006²², 2007²³ e 2008²⁴. Figueiredo¹² em estudo sorológico realizado durante o período de 2005 a 2007, na Cidade de Manaus, verificou 57,5% de positividade para DENV 3.

A alta (53%) prevalência de mosquitos infectados refletiu-se no aumento do número de casos de dengue nos anos subsequentes ao estudo. Em 2007, Manaus registrou 2.731 casos de dengue, e entre janeiro e abril de 2008, foram notificados 4.537 casos de dengue, caracterizando uma epidemia na cidade²⁴.

A ocorrência de mosquitos infectados foi observada em grande parte dos bairros que compõem as diferentes zonas da cidade de forma heterogênea. A prevalência de infecção nos mosquitos, ao longo do período estudado, foi de 23% na zona Leste, 70% na zona Centro-oeste, 60% na Sul e 53% na zona Oeste. Estudos sorológicos obtiveram distribuição semelhante. Bastos³ observou que a distribuição dos casos de dengue era menor na zona Leste (9%) e maior na zona Sul (25%) e Figueiredo¹² observou uma maior positividade de casos de dengue nas zonas Centro-oeste, Sul e Oeste. Os dados destes estudos corroboram os resultados deste trabalho, uma vez que as zonas com maior prevalência de mosquitos infectados, são as zonas com mais casos de dengue notificados.

A prevalência de mosquitos infectados foi maior nas zonas cujas populações possuem nível socioeconômico mais elevado e os bairros apresentam melhor infraestrutura. Resultados semelhantes foram encontrados em inquéritos soro-epidemiológicos nas Cidades de Fortaleza, CE²⁸ e São Luis, MA²⁷, onde foi observada uma maior soroprevalência de dengue na população com maior renda. Tais achados podem ser explicados em função do hábito das pessoas mais favorecidas em cultivar plantas aquáticas e o uso de materiais descartáveis. O uso excessivo de enlatados sem cuidado no seu descarte, também, poderia ser um fator que contribuiria para esta situação, uma vez que estes objetos tendem a tornar-se criadouros de mosquitos^{27,28}.

Considerando o homem como principal hospedeiro no ciclo de transmissão urbano do vírus dengue, a detecção apenas do DENV 3 mostra que a maior parte da população de Manaus está imune aos vírus DENV 1 e DENV 2. Uma vez que estes sorotipos circularam na cidade, em anos anteriores, e parte da população se infectou com esses sorotipos produzindo anticorpos contra estes tipos infectantes. Com a introdução do DENV 3, a população se encontrava susceptível a este sorotipo, o que pode ter facilitado a sua dispersão e a maior facilidade de detectá-lo, tanto em mosquitos como em humanos.

O conhecimento dos sorotipos circulantes numa localidade é fundamental, pois se sabe que alguns vírus causam manifestações

clínicas mais severas, fato observado mais comumente em locais com circulação simultânea de diferentes sorotipos². Segundo Passos e cols¹⁸, indivíduos acometidos pelo DENV 3 apresentam sintomatologia mais grave, apresentando chance 6,07 vezes maior de apresentar choque em relação aos indivíduos infectados com DENV 2, sugerindo maior virulência deste sorotipo. Este fato nos permite concluir que a população de Manaus poderia vir a apresentar um maior número de casos graves da doença, uma vez que todos os mosquitos infectados o estavam pelo DENV 3.

A investigação das taxas de infecção em mosquitos fornece informações sobre os sorotipos circulantes em determinadas localidades, antes que a doença esteja sendo transmitida em níveis mais elevados, possibilitando a implementação de medidas preventivas evitando epidemias. Os mosquitos infectados podem ser detectados seis semanas antes do começo de surtos²¹.

O monitoramento da circulação viral em vetores, com a técnica de RT-PCR, apresenta-se como alternativa, permitindo identificar com antecedência e confiabilidade os níveis de disseminação do vírus, e se faz extremamente necessário na Cidade de Manaus devido a introdução do novo sorotipo DENV 4, ajudando a determinar os locais para aplicar as políticas públicas de controle.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos bolsistas; Rossicleide Dias Batista, Renah Boanerges de Q. Pimentel, Ridenilcia Regina Nelson da Silva e Suziane de Souza Viana, pelo trabalho de campo e auxílio nos trabalhos técnicos laboratoriais.

REFERÊNCIAS

1. Araújo GCA, Travassos da Rosa ES, Vasconcelos HB, Nunes MRT, Carvalho CLC, Rodrigues SG, Cruz ACR, Vasconcelos P. Sorotipos de dengue isolados no Instituto Evandro Chagas no ano de 2002. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 36 (supl I): 16, 2003.
2. Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, Cuadra R, Rocha J, Pérez MA, Silva S, Rocha C, Harris E. Serotype-Specific differences in clinical manifestations of dengue. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 74: 449-456, 2006.
3. Bastos MS. Perfil soropidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.
4. Bricks LF. Vacinas para a dengue: perspectivas. *Pediatria* 26: 268-281, 2004.
5. Cabezas C. Dengue em el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 22: 212-228, 2005.
6. Câmara FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRF, Câmara DCP, Matos RRC. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 192-196, 2007.
7. Chao D, Davis BS, Chang GJ. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 584-589, 2007.
8. Chaturvedi UC. The curse of dengue. *Indian Journal Medical Research* 124: 467-470, 2006.
9. Chow VTK, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, Lam-Phua SG, Tan BT. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*

- mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 58: 578-586, 1998.
10. Degallier N, Teixeira JMS, Soares SS, Pereira RD, Pinto SCF, Chaib AJM, Vasconcelos PFC, Oliveira E. *Aedes albopictus* may be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. *Revista de Saúde Pública* 37: 386-387, 2003.
 11. Figueiredo LTM, Batista WC, Kashima S, Nassar ES. Identification of **brasilian** flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using *Flavivirus* universal primers. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 59: 357-362, 1998.
 12. Figueiredo RMP. Caracterização Molecular e Epidemiológica dos Vírus Dengue no Estado do Amazonas, Brasil, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.
 13. Figueiredo RMP, Thatcher BD, Lima ML, Almeida TC, Alecrim WD, Guerra MVE. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 476-479, 2004.
 14. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 480-496, 1998.
 15. Guzman MG, Kouri G. Dengue: uma atualização. *Coleção estudos da cidade* 47: 1-17, 2002.
 16. Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, Chang G, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 545-551, 1992.
 17. Lourenço-de-Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, Silva WC, Leite PJ, Nogueira RMR. Dengue Vírus Type 3 Isolation from *Aedes aegypti* in the Municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 799-800, 2002.
 18. Passos MNP, Santos LMJG, Pereira MRR, Casali CG, Fortes BPMD, Valencia LIO, Alexandre AJ, Medronho RA. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 293-295, 2004.
 19. Pinheiro VCS, Tadei PW. 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* 44: 245-250, 2002.
 20. Pinheiro VCS, Tadei WP, Barros PMSS, Vasconcelos PFC, Cruz ACR. Detection of dengue vírus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 833-839, 2005.
 21. Samuel PP, Tyagi BK. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian Journal Medical Research* 123: 615-628, 2006.
 22. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim: Situação epidemiológica da dengue até Dezembro de 2006. [acesso em 28 nov. 2007]. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/boletim_dengue_dez2006.pdf>.
 23. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe epidemiológico da dengue, janeiro a novembro de 2007. [acesso em 28 nov. 2007] Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://congressoemfoco.ig.com.br/UserFiles/Image/MS.doc>>.
 24. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe epidemiológico da dengue, janeiro a abril de 2008. [acesso em 16 ago 2008] Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_2803.pdf>.
 25. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cadernos de Saúde Pública* 17: 99-102, 2001.
 26. Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde* 8: 5-33, 1999.
 27. Vasconcelos PFC, Lima JWO, Raposo ML, Rodrigues SG, Travassos da Rosa JFS, Amorim SMC, Travassos da Rosa ES, Moura CMP, Fonseca N, Travassos da Rosa APA. Inquérito soro-epidemiológico na Ilha de São Luis durante epidemia de dengue no Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 171-179, 1999.
 28. Vasconcelos PFC, Lima JWO, Travassos da Rosa APA, Timbó MJ, Travassos da Rosa ES, Lima HR, Rodrigues SG, Travassos da Rosa JFS. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. *Revista de Saúde Pública* 32: 447-454, 1998.