

Revisiones



Detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos

Detection of dengue virus in natural populations of mosquitoes

Ana Caroline Dalla Bona¹, Adriana Lacerda Twerdochlib¹ & Mário Antônio Navarro-Silva^{1*}

RESUMO

A dengue é causada por um *Flavivirus* que apresenta elevada diversidade genética, com quatro sorotipos e vários genótipos. A enfermidade é endêmica na maioria dos países das Américas, e as fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) são as únicas transmissoras, com importância epidemiológica. Um único mosquito infectado permanece assim pelo resto de sua vida, podendo infectar múltiplos hospedeiros humanos. Com a detecção do vírus da dengue em mosquitos, podemos revelar o sorotipo circulante ou a entrada de um novo sorotipo em uma determinada região, sem quaisquer implicações éticas, além de apresentar reprodutibilidade dos resultados. Esta revisão aborda as técnicas para detecção viral em mosquitos, suas vantagens e limitações, bem como as pesquisas já realizadas com populações naturais de *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: RT-PCR, PCR em tempo real, Isolamento viral, *Flavivirus*.

SUMMARY

Dengue is caused by *Flavivirus* which exhibits high genetic diversity, with four serotypes and various genotypes. The disease is endemic in most countries in the Americas, and the female *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) are the only transmitters of epidemiological importance. A single infected mosquito remains so for the rest of his life and can infect multiple human hosts. For dengue virus detection in mosquitoes, the circulating serotype can be revealed or detect an entry of a new serotype in the region, without any ethical implications, and reproducible results. This review covers the techniques for detecting virus in mosquitoes, their advantages and limitations, as well as previous studies with natural populations of *Aedes aegypti*.

Key words: RT-PCR, real time PCR, Virus isolation, *Flavivirus*.

RESUMEN

El dengue es causado por un *Flavivirus* que presenta una alta diversidad genética, cuatro serotipos y varios genotipos. Esta enfermedad es endémica en la mayoría de los países del continente Americano y sólo las hembras de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) son las transmisoras de esta enfermedad de importancia epidemiológica. Un único mosquito infectado permanece así por el resto de su vida pudiendo infectar múltiples hospederos humanos. El detectar el serotipo de virus de dengue presente en los mosquitos permite conocer, ya sea, el serotipo circulante o el ingreso de un nuevo serotipo a una determinada región sin ningún tipo de implicaciones éticas presentando así resultados reproducibles. Ésta revisión aborda las técnicas de detección viral en mosquitos, sus ventajas y limitaciones, así como estudios previos con poblaciones naturales de *Aedes aegypti*.

Palabras clave: RT-PCR, PCR en tiempo real, Aislamiento viral, *Flavivirus*.

¹ Universidade Federal do Paraná. Departamento de Zoologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia. Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária. Caixa postal 19020. CEP: 81531-980. Curitiba, Paraná, Brasil.

*Autor de correspondencia: mnavarro@ufpr.br

INTRODUÇÃO

A dengue, durante o último século, ampliou sua distribuição geográfica e gravidade para se tornar a mais comum infecção por arbovírus dos seres humanos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A pandemia pode ser atribuída a diversos fatores como intenso processo de urbanização não acompanhado de sustentabilidade ambiental, dispersão geográfica dos vetores, interação e evolução dos quatro sorotipos do vírus, ineficiência de ferramentas de controle, resistência a inseticidas químicos, alocação de recursos para métodos ineficazes e ineficiência de alguns indicadores da densidade de *Aedes aegypti* (Eisen *et al.*, 2009; Endy *et al.*, 2010).

Para que uma epidemia de dengue ocorra, é necessária a presença do agente etiológico, do mosquito com capacidade vetora e de hospedeiros suscetíveis. O agente etiológico da dengue pertence a família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* com 4 sorotipos distintos (DENV-1 a 4). Cada um desses sorotipos possui vários genótipos difundidos na mesma região ou em diversas partes do mundo (Holmes & Burch, 2000; Lupi, 2011).

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

A competência do vetor em transmitir um patógeno é resultante da habilidade do vetor de infectar-se, propiciar a multiplicação e transmissão do agente etiológico ao novo hospedeiro. Um mosquito pode ser genética e bioquimicamente compatível para o desenvolvimento completo de um patógeno particular, mas se a espécie não coexistir temporalmente e espacialmente com um hospedeiro vertebrado que abriga o agente etiológico, ou se a fonte de sangue para esta espécie não inclui esse vertebrado, este mosquito não é um vetor oportuno para transmissão do patógeno (Forattini, 1992; Beerntsen *et al.*, 2000).

Para um vetor tornar-se infectante as partículas de vírus adquiridas durante o repasto sanguíneo devem alcançar o epitélio do intestino médio, replicar, e atravessar esta barreira principal em direção a hemocele. A replicação do vírus e a disseminação acontecem célula a célula no corpo

do mosquito e finalmente o vírus alcança o epitélio da glândula salivar. Depois da replicação viral nas glândulas salivares, o mosquito infectado pode transmitir o vírus ao hospedeiro vertebrado suscetível pelo resto da vida (Castro *et al.*, 2004; Malavige *et al.*, 2007). Esta vantagem permite que o diagnóstico do arbovírus seja eficaz em qualquer período da vida do mosquito após a infecção.

Os mosquitos também podem infectar-se através da transmissão transovariana e venérea. Na transmissão vertical, a fêmea pode infectar sua progênie, ao passo que na transmissão venérea, o macho infecta a fêmea durante a cópula. É possível que a transmissão transovariana represente uma maneira de manutenção do vírus da dengue na natureza, pois o vírus pode persistir até a sétima geração nos tecidos dos mosquitos (Kow *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2002).

Atualmente, várias técnicas específicas, rápidas e com baixos limiares de detecção do vírus estão disponíveis, cada uma com suas vantagens e limitações. O diagnóstico para o vírus da dengue em mosquitos é realizado através do isolamento viral, detecção do antígeno viral e técnicas moleculares. Este trabalho tem como objetivo revisar os métodos utilizados para detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos.

Isolamento viral

O isolamento viral é considerado o padrão ouro utilizado na detecção do vírus da dengue gerando uma resposta qualitativa (presença ou ausência do vírus) e diferencial. Outros métodos podem fornecer uma resposta quantitativa, como o número de partículas virais. Três métodos de isolamento viral podem ser utilizados: inoculação intracerebral em camundongo, inoculação em cultura de células de mosquitos e mamíferos, e inoculação intratorácica em mosquitos adultos (Ahmed, 2005).

A inoculação intracerebral em camundongos neonatos pode demorar até três semanas para que se tenha um diagnóstico conclusivo a respeito da infecção pela arbovirose, e necessita de um biotério com condições adequadas de biossegurança para a criação e manutenção dos camundongos. Nas técnicas que utilizam culturas de células, os riscos de contaminação são elevados, por isso devem ser realizadas sob condições estéreis e protegidas de

outros microorganismos como fungos e bactérias. A cultura de células de mamíferos apresenta menor sensibilidade para a detecção desse vírus e requer múltiplas passagens antes de induzir o efeito citopático nas células infectadas. A inoculação intratorácica de mosquitos *Toxorhynchites* é a técnica mais sensível, porém necessita da criação em larga escala de mosquitos. E por fim, a inoculação em cultura de células de mosquitos tem sido o método mais utilizado, apresentando vantagens em relação às outras como: baixo custo, sensibilidade, fácil manutenção da temperatura e a culturas podem ser mantidas por 14 dias sem a troca do meio de cultura (De Paula & Fonseca, 2004; Samuel & Tyagi, 2006).

Para a inoculação em cultura de células de mosquitos existem diferentes tipos celulares: *Aedes pseudoscutellaris* (AP61), *Aedes albopictus* (clone C6/36), *Aedes aegypti* (CCL-125). As células de *Ae. albopictus* (clone C6/36) têm sido as mais utilizadas para isolamento do vírus dengue na maioria dos laboratórios especializados, pois apresentam elevado grau de suscetibilidade para infecções com arbovírus (White, 1987; Wikan *et al.*, 2009).

Nessa técnica, os mosquitos são macerados e inoculados isoladamente ou em lotes de cultivos celulares (C6/36). As amostras são processadas em até 21 dias, ou até a aparição de efeito citopático. O método apresenta algumas desvantagens como o tempo necessário para obtenção dos resultados, e a necessidade de exigir uma ou duas passagens para se obter o isolamento viral (Degallier *et al.*, 2001; Palomino *et al.*, 2010). O efeito citopático é resultante da infecção que depende da linhagem de células e da cepa do vírus utilizada. O DENV-4, por exemplo, possui efeito muito discreto, o que torna mais difícil a detecção desse efeito em células infectadas por essa variante. A detecção de células infectadas se faz por imunofluorescência indireta com anticorpos específicos (Henchal & Putnako, 1990; Travassos da Rosa *et al.*, 1994).

As tentativas de detecção do vírus da dengue utilizando a técnica de isolamento viral em mosquitos, mesmo em municípios com elevado número de casos em humanos e altos índices de infestação do vetor, são pouco frequentes. Muitas vezes é necessário realizar coletas de mosquitos em locais que já possuem pacientes acometidos pela doença, para ampliar as chances de isolamento do vírus em mosquitos. Serufo *et al.* (1993) isolaram a partir de 743 larvas de *Ae.*

albopictus, 2 lotes de larvas positivas para DENV-1 no Estado de Minas Gerais. Degallier *et al.* (2003) analisando 23 “pools” de *Ae. aegypti* capturados no Estado do Espírito Santo, verificaram apenas uma amostra positiva para DENV-1. Lourenço-de-Oliveira *et al.* (2002) isolaram DENV-3 em três “pools” de nove fêmeas de *Ae. aegypti*, a partir de 2.164 indivíduos capturados em Nova Iguaçu (Rio de Janeiro).

Muitas vezes a dificuldade em encontrar o vírus no mosquito se dá pela conservação do material. Quando o objetivo é conservar o vírus ou o material suspeito, a temperatura máxima deve ser igual a -70° C. Sob elevada temperatura e umidade o RNA está sujeito à degradação rápida, pela atividade de microrganismos (bactérias e fungos saprófitos). As proteases que envolvem a decomposição da célula também dificultam a detecção do vírus depois de um período relativamente curto (Bangs *et al.*, 2007).

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

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

Tradicionalmente o RT-PCR envolve dois ciclos de reação: a transcrição reversa e a amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase). Primeiramente o RNA é transcrito em cDNA, através da enzima transcriptase reversa. Este cDNA é amplificado por PCR usando primers específicos. O produto amplificado pode ser visualizado em gel de agarose, com bandas de diferentes tamanhos, dependendo do sorotipo do DENV em questão. Este, constitui-se um método de rotina para isolar rapidamente sequências específicas a partir de uma mistura complexa de sequências genômicas ou de cDNAs. Amplificando, assim, mínimas quantidades

de ácido nucléico, mesmo em vírus inativos. É uma técnica qualitativa (presença ou ausência do vírus) que determina os sorotipos circulantes, e pode ser finalizada com o seqüenciamento do produto amplificado, para verificação do genótipo em questão (Acosta-Bas & Gómez-Cordero, 2005; De Paula & Fonseca, 2004).

Diversos protocolos de RT-PCR têm sido descritos para a detecção do vírus dengue, dentre eles, o descrito por Lanciotti *et al.* (1992). Esses autores desenvolveram a técnica RT-PCR seguida de *nested* PCR, para diagnóstico dos sorotipos da dengue. O *nested* PCR consiste na amplificação de uma sequência alvo que esta dentro de uma sequência mais abrangente produzida na primeira reação de amplificação. Desde a extração do RNA até a análise no gel de agarose o tempo requerido é em média 30 horas. Para minimizar a contaminação, aumentar rentabilidade, diminuir o risco de inibição da PCR e degradação do RNA, Harris *et al.* (1998) reduziram os dois passos para uma simples reação, com o uso da enzima bifuncional termoestável, que faz ao mesmo tempo a transcrição reversa e a amplificação do cDNA. Muitos outros protocolos têm sido desenvolvidos e aprimorados (Morita *et al.*, 1991; Chow *et al.*, 1993; Seah *et al.*, 1995; Kuno *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2002; Liotta *et al.*, 2005; Bronzoni *et al.*, 2005), esses variam na amplificação genômica (E, NS1, E/NS1, prM/E, NS5, NS5/3'), especificidade e sensibilidade (Guzmán & Kouri, 2004).

Bangs *et al.* (2007) observaram através da técnica RT-PCR, que o RNA viral do dengue, mantém sua integridade para ser detectado em mosquitos mortos com até 13 semanas após a exposição à temperatura ambiente de 26,3 a 31,7°C e umidade relativa de 49,4 a 69,9%. Estes autores confirmaram que a necessidade de testar mosquitos frescos ou congelados não é um requisito para o RT-PCR. Cáceres *et al.* (2003) detectaram o vírus da dengue em 58,3% das amostras de mosquitos acondicionadas em álcool 70% no freezer a -20°C, permitindo este um meio mais conveniente para conduzir atividades de vigilância entomológica e virológica.

As formas imaturas do vetor também devem ser incluídas na vigilância virológica, já que estas podem estar atuando na manutenção do vírus em períodos interepidêmicos. Cecílio *et al.* (2009) investigando a transmissão transovariana observaram que 48,6% dos lotes de larvas de *Ae. albopictus* eram positivas para o vírus da dengue em Belo Horizonte

(Minas Gerais). Também no Estado de Minas Gerais Pessanha *et al.* (2011) detectaram 43 amostras de larvas de *Ae. aegypti* positivas para mais de um sorotipo do vírus da dengue, mostrando que a co-infecção pode ser repassada via transmissão transovariana. As fêmeas de mosquitos infectadas através da transmissão transovariana, não precisam necessariamente fazer o repasto sanguíneo em um hospedeiro virêmico para infectar um hospedeiro suscetível (Guedes *et al.*, 2010).

A técnica de RT-PCR tem demonstrado ser uma boa ferramenta na vigilância virológica de mosquitos adultos. Urdaneta *et al.* (2005) detectaram os sorotipos DENV-1, 2 e 3, sendo que o maior número de "pools" de mosquitos infectados foi encontrado a oito semanas antes do aumento da epidemia de casos de dengue em Maracay (Venezuela). Chow *et al.* (1998) detectaram *Ae. aegypti* infectado com vírus da dengue em Cingapura, seis semanas antes do início da epidemia de dengue em 1995 e 1996. Isso demonstra que um sistema de vigilância epidemiológica pró-ativa é capaz de detectar com antecedência a propagação viral e os sorotipos circulantes.

A captura de culicídeos em locais onde ocorrem casos de dengue, aumentam as chances da detecção viral no mosquito, facilitando o encontro de amostras positivas (Pinheiro *et al.*, 2005; Urdaneta *et al.*, 2005). No entanto, para que a vigilância virológica em mosquitos ocorra de forma efetiva, as coletas devem ser realizadas em múltiplos pontos da região analisada. Alves da Costa *et al.* (2009) coletaram mosquitos em 46 bairros da Cidade de Manaus (Amazonas) encontrando 80% das fêmeas de *Ae. aegypti* positivas para DENV-3. A ocorrência de mosquitos infectados foi observada em grande parte dos bairros que compõem as diferentes regiões da cidade. De La Mora-Covarrubias *et al.* (2010) detectaram a transmissão viral em 57% das amostras de *Ae. aegypti* no Estado de Chihuahua, no México, georreferenciando os pontos de coleta de mosquitos, pois a implementação de técnicas geoespaciais aliada a detecção viral, proporciona informações úteis para ações futuras no controle do vetor.

A vigilância entomológica contínua do vírus da dengue nas populações de *Ae. aegypti* em campo é uma ferramenta poderosa para monitorar os sorotipos circulantes, bem como a entrada de novos sorotipos, a fim de orientar as medidas de controle com agilidade previamente ao estabelecimento da epidemia do

dengue e aparecimento de casos da síndrome de choque da dengue.

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

O RT-PCR em tempo real é a reação que inclui um corante fluorescente ou sonda marcada para a detecção do cDNA amplificado à medida que este está sendo produzido. Os produtos da reação são detectados em tempo real, sem a necessidade de realizar a eletroforese, além de quantificar o número de fragmentos de cDNA presentes na amostra e informar em qual ciclo cada amostra ultrapassa o limiar de detecção ajustado (cycle threshold). A combinação de excelente sensibilidade e especificidade, risco baixo de contaminação, facilidade de desempenho e velocidade, faz com que a tecnologia de RT-PCR em tempo real seja uma alternativa mais atraente do que os métodos convencionais utilizados na microbiologia clínica para diagnosticar muitas doenças infecciosas (Novais & Pires-Alves 2004; Bustin *et al.*, 2005; Espy *et al.*, 2006). Algumas desvantagens são apresentadas por esta técnica, como por exemplo, a necessidade de uma plataforma de instrumentação, sondas marcadas com elevado custo e alta habilidade técnica e suporte. Uma das principais desvantagens do PCR em tempo real no diagnóstico viral é a falta de correlação entre a detecção de ácido nucléico viral e a presença de partículas infectantes que formam as unidades formadoras de placas. Estas só podem ser detectadas utilizando a cultura de células (Bae *et al.*, 2003; Watzinger *et al.*, 2006), Conceição *et al.* (2010) descreveram os procedimentos do RT-PCR em tempo real para detecção do vírus da dengue em mosquitos. Yang *et al.* (2010) utilizando o RT-PCR em tempo real detectaram 2 lotes de 43 fêmeas de *Ae. aegypti* positivos para DENV-1 em Taiwan (taxa de infecção de 0,18 por 1000 fêmeas). Este estudo foi o primeiro a quantificar a carga viral em mosquitos individuais ao longo de um período de incubação extrínseca de 16 dias. Também em Taiwan, Chen *et al.* (2010) encontraram 0,2% lotes de *Ae. aegypti* infectados com o vírus da dengue num total de 7628 lotes.

O RT-PCR em tempo real é um método conveniente e confiável que fornece novas pistas sobre as interações vetor do vírus, principalmente no que diz respeito à quantificação do vírus no vetor (Richardson *et al.*, 2006). No entanto é necessário cuidado na análise dos resultados, já que o método também amplifica

partículas virais não infectantes. Muitas metodologias ainda estão sendo padronizadas (Lanciotti *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2007;) com mosquitos experimentalmente infectados.

Amplificação isotérmica baseada na seqüência de ácido nucléico em tempo real (NASBA em tempo real)

NASBA é uma técnica de amplificação de RNA isotérmica que é realizada através da reação de três enzimas; avian myeloblastosis-reverse transcriptase (AMV-RT), T7-RNA polymerase, e RNase-H. A amplificação do produto pode ser detectada por eletroquimioluminescência. A análise completa de 20 amostras dura aproximadamente cinco horas (Wu *et al.*, 2001). O método NASBA apresenta algumas vantagens em relação aos demais: amplificação rápida e cinética, sem a necessidade de termociclagem.

Hutama *et al.* (2007) analisaram imaturos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na Tailândia através da amplificação isotérmica e não detectaram transmissão transovariana. Jittmittraphap *et al.* (2006) utilizaram esta técnica para verificação do vírus da dengue nos segmentos corpóreos de *Ae. aegypti* experimentalmente infectados. Para a detecção NASBA, os sinais foram amplificados principalmente no tórax, depois na cabeça e por último o abdômen. Podendo esta ser outra ferramenta na detecção do vírus da dengue em mosquitos de campo.

Ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno

Entre os testes sorológicos para o diagnóstico da dengue, os ensaios imunoenzimáticos são os mais sensíveis, rápidos e com elevada especificidade, sendo amplamente usados na detecção do vírus da dengue, principalmente em humanos (Barreira *et al.*, 2010). As limitações deste teste incluem a especificidade destes antígenos e reatividade cruzada com outros arbovírus circulantes (Buchy *et al.*, 2007)

Alguns trabalhos utilizaram ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção do vírus no mosquito em populações naturais (Tewari *et al.*, 2004; Srisuphanunt *et al.*, 2007), bem como estimaram a transmissão vertical (Arunachalam *et al.*, 2008; Thenmozhi *et al.*, 2007). Thenmozhi *et al.*, (2005) demonstraram que temperaturas de armazenamento entre 31 a 34° C por até quatro semanas não afetavam

a reatividade dos ensaios imunoenzimáticos. Sendo esta ferramenta potencial para monitoramento do vírus em áreas endêmicas, pois a capacidade de testar os mosquitos mortos aumenta o número de indivíduos disponíveis para testes no programa de vigilância.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vigilância virológica da dengue nos vetores apresenta maior viabilidade, reprodutibilidade sem implicações éticas, em comparação com humanos. No mosquito, o vírus pode utilizar diversos tecidos para a sua multiplicação e manutenção. Após um período de incubação extrínseco, o vetor torna-se infectante, assim permanecendo pelo resto da vida. Em populações humanas, a viremia apresenta um período curto, dificultando o processo de detecção viral.

O método a ser utilizado para a detecção do vírus no vetor depende das instalações do laboratório e do nível de biossegurança. O isolamento viral em cultura de células de mosquitos ainda é a técnica mais utilizada, no entanto o diagnóstico final pode durar semanas. Por isso, com essa técnica seria inviável o monitoramento em larga escala do vírus em populações naturais de *Ae. aegypti*. Já as técnicas moleculares são mais sensíveis para detecção viral, disponibilizam o resultado em poucas horas. Outras ferramentas de diagnósticos virais disponíveis necessitam de mais avaliações quanto ao desempenho em populações naturais de vetores.

Apesar do número expressivo de investigações realizadas ainda existe a necessidade de melhorias técnicas nos procedimentos de detecção viral a fim de padronizar um sistema de vigilância rápido e econômico, capaz de detectar o vírus em mosquitos mortos sem conservação sob refrigeração. Viabilizando a análise de elevado número de lotes de mosquitos, reduz-se o tempo de fornecimento de respostas aos órgãos oficiais responsáveis pelas execuções das medidas de controle dos vetores. Ampliando em qualidade o sistema sentinela de alerta das situações epidêmicas.

CONFLITOS DE INTERESSES

Nós autores declaramos que não existe conflitos de interesses em relação ao presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

CNPq, processo #305038/2009-5 e processo # 140231/2008-0.

REFERÊNCIAS

- Acosta-Bas C. & Gómez-Cordero I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev. Biomed.* **16**: 113-137.
- Ahmed A. (2005). Diagnosing dengue fever. *Pakistan. Infect. Dis J.* **14**: 129-132.
- Alencar C. H. M., Albuquerque L. M., Aquino T. M. F., Soares C. B., Ramos Júnior A. N., Lima J. W. O. & Pontes R. J. S. (2008). Potencialidades do *Aedes albopictus* como vetor de arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária. *Rev. APS.* **11**: 459-467.
- Alves da Costa C., Santos I. G. C. & Barbosa M. G. (2009). Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **42**: 677-681.
- Arunachalam N., Tewari S. C., Thenmozhi V., Rajendran R., Paramasivan R., Manavalan R. *et al.* (2008). Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J. Med. Res.* **127**: 395-397.
- Bae H. G., Nitsche A., Teichmann A., Biel, S. S. & Niedrig M. (2003). Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *J. Virol. Methods.* **110**: 85-191.
- Bangs M. J., Pudiantari R. & Gionar Y. R. (2007). Persistence of dengue virus RNA in dried *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to natural tropical conditions. *J. Med. Entomol.* **44**: 163-167
- Barreira L. A. C., Machado A. M., Aquino V. H., Badra S. J. & Figueiredo L. T. M. (2010). Padronização e uso de um método imunoenzimático que utiliza células infectadas como antígeno no diagnóstico rotineiro do dengue. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **43**: 268-271.
- Beerntsen B. T., James A. A. & Christensen B. M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 115-137.
- Bronzoni, R. V. M., Baleotti F. G., Nogueira R. M. R., Nunes M. & Figueiredo L. T. M. (2005). Duplex reverse transcription-PCR followed by *nested* PCR

- assays for detection and identification of Brazilian Alphaviruses and *Flaviviruses*. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 696-702.
- Buchy P., Yoksan S., Peeling R. W & Hunsperger E. (2007). *Laboratory tests for the diagnosis of dengue virus infection*. Report of the Scientific Working Group on Dengue Meeting 1-5 October 2006, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases UNICEF/UNDP/World Bank and WHO.
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T. & Pfaffl M. W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* **34**: 597-601.
- Cáceres R. O. (2003) Detección rápida de los serotipos del virus dengue en el mosquito *Aedes aegypti*. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica.* **20**: 156-158.
- Castro M. G., Nogueira R. M. R., Schatzmayr H. G., Miagostovich M. P. & Lourenço de Oliveira R. (2004). Dengue virus detection by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 809-814.
- Cecílio A. B., Campanelli E. S., Souza K. P. R., Figueiredo L. B. & Resende M. C. (2009). Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Braz. J. Biol.* **69**: 123-127.
- Chao D. Y., Davis B. S. & Chang G. J. J. (2007). Development of multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR assays for detecting eight medically important Flaviviruses in mosquitoes. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 584-589.
- Chen C. F., Shu P. Y, Teng H. J., Su C. L., Wu J. W., Wang J. H. *et al.* (2010). Screening of dengue virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by One-Step SYBR Green-Based Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction assay during 2004-2007 in Southern Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**: 1017-1027.
- Chow V. T. K., Chan I. C., Yong R., Lee K. M., Lim L. K., Chung Y. K. *et al.* (1998). Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 578-586.
- Chow V. T. K., Seah C. L. K. & Chan Y. C. (1993). Use of NS 3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other Flaviviruses. *Arch. Virol.* **133**: 157-170
- Chung Y. K. & Pang F. Y. (2002). Dengue virus infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. *Trop. Med. Int. Health.* **7**: 322-330.
- Conceição T. M., Da Poian A. T., Sorgine M. H. F. (2010). A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *J. Virol. Methods.* **163**: 1-9.
- De la Mora-Covarrubias A., Jiménez-Vega F. & Treviño-Aguilar S. M. (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Pública Mex.* **52**: 127-133.
- De Paula S. O. & Fonseca B. A. L. (2004). Dengue: A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz. J. Infect. Dis.* **8**: 390-398.
- Degallier N., Teixeira J. M. S., Chaib A. J. M., Barbosa H. F., Carvalho M. S. L., Oliveira C. & Knox M. B. (2001). Avaliação do risco de transmissão silvestre da dengue no Brasil. *Inf. Epidemiol. Sus.* **10**: 13-15.
- Degallier N., Teixeira J. M. S., Soares S. S., Pereira R. D., Pinto S.C.F., Chaib A. J. M. *et al.* (2003). *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. *Rev. Saúde Pública.* **37**: 386-387.
- Eisen A., Beaty B. J., Morrison A. M. & Scott T. W. (2009). Proactive vector control strategies and improved monitoring and evaluation practices for dengue prevention. *J. Med. Entomol.* **46**: 1245-1255.

- Endy T. P., Weaver S. C. & Hanley K. A. (2010). Dengue virus - past, present and future. pp. 3-9. In: Hanley, K. A., Weaver, S. C. (Eds.). *Frontiers in Dengue Virus Research*. Horizon Press, Norwich, U.K.
- Espy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F. & Vetter E. A. (2006). Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 165–256.
- Forattini, O. P. (1992). *Ecologia, Epidemia e Sociedade*. Ed. São Paulo. Universidad de São Paulo, Brasil.
- Guedes D. R. D., Cordeiro M. T., Melo-Santosa M. A. V., Magalhaes T., Marques E., Regis L. *et al.* (2010). Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J. Vector Borne Dis.* **47**: 67–75
- Guzmán M. G. & Kourí G. (2004). Dengue diagnosis advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.* **8**: 69-80.
- Harris E., Roberts T. G., Smith L., Selle J., Kramer L. D., Valle S. *et al.* (1998). Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2634-2639.
- Henchal E. A. & Putnako R. (1990) The Dengue Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 376-396.
- Holmes E. C. & Burch S. S. (2000). The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends in Microbiol.* **8**: 74-77.
- Hutamai S., Suwonkerd W., Suwannchote N., Somboon P. & Prapanthadara L. (2007). A survey of dengue viral infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from re-epidemic areas in the north of Thailand using nucleic acid sequence based amplification assay. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* **38**: 448-454.
- Jennifer L. Kyle, J. L. & Harris E. (2008). Global Spread and Persistence of Dengue. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**: 71–92
- Jittmitrathap A., Thammaphalo S., Ratanasetyuth N., Wongba N., Mammen M. P. & Jampangern W. (2006) Rapid detection of dengue viral RNA in mosquitoes by nucleic acid-sequence based amplification (NASBA). *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* **37**: 1117-1124.
- Joshi V., Mourya D. T. & Sharma R. C. (2002). Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**: 158-161.
- Kow C. Y., Koon L. L. & Yin P. F. (2001). Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. *J. Med. Entomol.* **38**: 475-479
- Kuno G. (1998). Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J. Virol. Methods.* **72**: 27-41.
- Lanciotti R. S., Calisher C. H., Gubler D. J., Chang G. J. & Vorndam A.V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 545-551.
- Lanciotti R. S., Kerst A. J., Nasci R. S., Godsey M. S., Mitchell C. J., Savage H.M. *et al.* (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4066–4071.
- Liotta D. J., Cabanne G., Campos R. & Tonon S. A. (2005). Molecular detection of dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* mosquitoes from northeastern Argentina. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**: 82-87.
- Lourenço-de-Oliveira R., Honório N. A., Castro M. G., Schatzmayr H. G., Miagostovich M. P. & Alves J. C. R. (2002). Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 799-800
- Lupi, O. (2011). Mosquito-Borne Hemorrhagic Fevers. *Dermatol Clin.* **29**: 33–38.
- Malavige G. N., Fernando S, Fernando D. J. & Sereviratne S. L. (2007). Dengue viral infectious. *Postg. Med. J.* **80**: 588-601.

- Morita K., Tanaka M. & Igarashi A. (1991). Rapid identification of dengue virus serotypes by using Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2107-2110.
- Novais C. M. & Pires-Alves M. (2004). PCR em tempo real. *Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* **33**: 10-13.
- Palomino M, Gutierrez V. & Salas R. (2010). Estandarización del método de centrifugación en placa para el aislamiento del virus dengue. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica.* **27**: 51-58.
- Pessanha J. E. M., Caiaffa W. T., Cecílio A. B., Iani F. C. M., Araujo S. C., Nascimento J. C. *et al.* (2011). Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvAe. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**: 103-105.
- Pinheiro V. C. S., Tadei W. P., Barros P. M. S. S., Vasconcelos P. F. C. & Cruz A. C. R. (2005). 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.* **100**: 833-839.
- Richardson J., Molina-Cruz A., Salazar M. I. & Black W. (2006). Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**: 132-141.
- Samuel P. P. & Tyagi B. K. (2006). Diagnostic methods for detection e isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian J. Med. Res.* **123**: 615-628.
- Santos F. B., Miagostovich M. P., Nogueira R. M. R., Edgil D., Schatzmayr H. G., Riley L. W. *et al.* (2002). Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 991-995.
- Seah C. L. K., Chow V. T. K., Tana H. C. & Chan Y. C. (1995). Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J. Virol. Methods.* **51**: 193-200.
- Serufo J. C., Oca H. M., Tavares V. A., Souza A. M., Rosa R.V., Jamal M.C. *et al.* (1993). Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88**: 503-504.
- Srisuphanunt M., Sithiprasasrab R., Patpoparn S., Attatippaholkund W & Wiwanitkote V. (2007). ELISA as an alternative tool for epidemiological surveillance for dengue in mosquitoes: a report from Thailand. *J. Vector Borne Dis.* **44**: 272-276.
- Tewari S. C., Thenmozhi V., Katholi C. R., Manavalan R., Munirathinam A. & Gajanana A. (2004). Dengue vector prevalence and virus infection in a rural área in south India. *Trop. Med. Int. Health.* **9**: 499-507.
- Thenmozhi V., Kabillan L., Samuel P. & Dash A. P. (2005). Detection of dengue virus antigens in desiccated mosquitoes: an improved tool for surveillance. *Trop. Med. Int. Health.* **10**: 187-189.
- Thenmozhi V., Hiriyan J. G., Tewari C., Samuel P. P., Paramasivan R., Rajendran R. *et al.* (2007). Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a Southern Indian State. *Jpn. J. Infect. Dis.* **60**: 245-249.
- Travassos Da Rosa A. P., Travassos Da Rosa E. S., Travassos Da Rosa J. F., Nicolas Dégallier N., Vasconcelos P. F. C., Rodrigues S. G. *et al.* (1994). *Os arbovirus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudos.* Doc. Téc. n° 2, Instituto Evandro Chagas, Fundação Nacional de Saúde. Belén, Pará, Brasil.
- Urdaneta L., Herrera F., Pernalet M., Zoghbi N., Rubio-Palis Y., Barrios R. *et al.* (2005). Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect. Genet. Evol.* **5**: 177-84.
- Watzinger F., Ebner K. & Lion T. (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Aspects Med.* **27**: 254-298.
- White L.A. (1987). Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1221-1224.

- Wikan N., Kuadkitkan A. & Smith D. R. (2009). The *Aedes aegypti* cell line CCL-125 is dengue virus permissive. *J. Virol. Methods*. **157**: 227–230.
- Wu S. J. L., Lee E. M., Putvatana R., Shurtliff R. N., Porter K. R., Suharyono W. *et al.* (2001). Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2794–2798.
- Yang C. F., Chen, C. F., Su C. L., Teng, K. J., Lu L. C., Lin, C. *et al.* (2010). Screening of mosquitoes using SYBR Green I-based real-time RT-PCR with group-specific primers for detection of *Flaviviruses* and *Alphaviruses* in Taiwan. *J. Virol. Methods*. **168**: 147–151.

Recibido el 13/06/2011
Aceptado el 11/10/2011