VIROLOGIE

Apparition des premiers cas autochtones causés par le sérotype Dengue-3 dans le District fédéral, Brésil.

J. M. S. Teixeira (1), A. J. M. Chaib (1), H. P. Silva (1), J. L. Souza (1), J.-F. Molez (2, 3) & N. Degallier (2, 3, 4)
(1) LACEN-DF : SGAN lote 601, 70830-010 Brasilia DF., Brésil.
(2) IRD-UR178 : C.P. 7091 Lago Sul, 71619-970, Brasilia DF, Brésil
(3) DIVAL-DF : SAIN lote 04, C.P.709, 70620-000 Brasilia-DF., Brésil.
(4) LOCEAN/IPSL UMR7159-IRD UR182, Tour 45-55, 4e ét., case 100, 4 place Jussieu 75252 Paris Cedex 05 France

Manuscrit n° 2811. "Virologie". Reçu le 28 avril 2005. Accepté le 28 juin 2005.

Summary: **First autochthonous cases, caused by the Dengue-3 serotype in Federal District, Brazil.**

During the first four months of 2003, the survey laboratory of the Federal District (LACEN Laboratory of Virology), Brasília, Brazil, isolated ten strains of dengue virus serotype 3, five of them autochthonous, and the remaining ones from cases imported from Tocantins, Goias and Bahia States. The virus isolations were performed in C6/36 cell culture inoculated with total blood collected between the 1st and the 5th days after the onset of the symptoms. The age of the patients varied from 26 to 59 years old. The strains were typed as DEN-3 by indirect immunofluorescence assay using serotype-specific monoclonal antibodies. Viral RNAs were extracted from total blood using the trizol method. The nested RT-PCR method detected DNA products of 290 bp, confirming the serotype identifications. The introduction of DEN-3 in Brazil and especially in the Federal District represents a serious threat, since most people are susceptible to this serotype and many have already been infected by serotypes DEN-1 or DEN-2, thus increasing the risk of epidemic of more severe forms of the disease. The use of a fast and reliable method for continuous monitoring of the circulation of this serotype is of primary importance for the prevention and control of future epidemics.

dengue
C6/36 cell culture
indirect immunofluorescence
RT-PCR
survey
viral isolation
laboratory
Tocantins
Goias
Bahia
Federal District
Brazil
South America

Résumé :

*Durant le premier quadrimestre 2003, le laboratoire central de surveillance virologique du District fédéral (LACEN, Brasília, Brésil) a isolé dix souches de virus dengue 3, dont cinq à partir de cas provenant des États du Tocantins, Goias et Bahia. Les isolements ont été réalisés sur cultures cellulaires C6/36 (*Aedes albopictus*), inoculées avec du sang total prélevé entre les 1er et 5e jours après le début des symptomes. L'âge des patients était compris entre 26 et 59 ans. Les souches ont été identifiées par un test d'immunofluorescence indirecte utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques du sérotype DEN3. Les ARN viraux ont été extraits du sang total par la méthode du trizol. La méthode du RT-PCR a permis de détecter des ADN de 290 bp, confirmant les identifications sérologiques. L'introduction du sérotype DEN3 au Brésil et dans le District fédéral représente un risque majeur d'apparition de cas graves de la maladie, car la plupart des habitants sont encore sensibles à ce sérotype mais ont déjà été infectés par les sérotypes DEN-1 ou DEN-2. L'utilisation d'une méthode rapide et fiable pour la surveillance continue de la circulation de ce sérotype est importante pour la prévention et le contrôle d'épidémies futures.*

dengue
culture cellulaire C6/36
immunofluorescence indirecte
RT-PCR
surveillance
isolement viral
laboratoire
Tocantins
Goias
Bahia
District fédéral
Brésil
Amérique du Sud

Introduction

La dengue est considérée actuellement comme l'un des problèmes les plus importants en santé publique dans le monde (2) : aussi cette infection est maintenant classée en catégorie 1 par l'OMS (29). Le virus de la dengue présente quatre sérotypes antigéniques distincts (19), désignés DEN-1 à DEN-4 et l'infection par l'un d'eux ne confère pas de protection durable contre une infection ultérieure par un autre sérotype (25, 28). Cette arbovirose est strictement urbaine en Amérique du Sud où *Stegomyia aegypti* – d'après la nomenclature présentée par REINERT, HARBACH et KITCHING (24) – en est le principal vecteur (5). La campagne d'éradication de la fièvre jaune, menée au cours de la décennie 1950-1960 avait permis d'éliminer *St. aegypti* de la majorité des pays américains, mais des épidémies de dengue se sont néanmoins produites dans quelques îles des Caraïbes pendant cette décennie (2).

À partir des années 1970, *St. aegypti* a progressivement réapparu sur le continent sud-américain, puis fut retrouvé au Brésil dans les États de Bahia en 1975 et de Rio de Janeiro en 1977 (26). L'isolement des sérotypes DEN-1 et DEN-4 en 1981 dans la ville de Boa Vista dans le Roraima a confirmé la réintroduction du virus de la dengue au Brésil (20). C'est seulement après l'épidémie de Rio de Janeiro en 1986, causée par le sérotype DEN-1, que la dengue est devenue un réel problème de santé publique dans l'ensemble du Brésil (7). L'épidémie causée par le sérotype DEN-2 en 1990, toujours dans l'État de Rio de Janeiro, a été la conséquence des imperfections du programme national de contrôle des vecteurs qui n'a pu empêcher la dispersion du virus et l'émergence d'épidémies secondaires dans différents États (3, 19, 31). Le sérotype DEN-3 a été isolé pour la première fois au Brésil en 1998 dans l'État de São Paulo chez un sujet ayant voyagé récemment au Nicaragua (14, 25). Cependant, le premier cas autochtone

causé par ce sérotype n'a été dépisté qu'en janvier 2001, chez un sujet de sexe féminin résidant dans la ville de Nova Iguaçu (État de Rio de Janeiro) et ayant présenté des symptômes de dengue classique (18). Des enquêtes entomologiques, conduites dans cette ville pendant les mois d'avril à mai 2001, ont permis d'isoler ce sérotype chez des lots de *St. aegypti*, confirmant la réalité de sa transmission dans l'État de Rio de Janeiro (17).

Dans le District fédéral (DF), la surveillance de la dengue avec identification des différents sérotypes a été mise en place depuis janvier 1991 au laboratoire de virologie du LACEN (Laboratório Central de Análise) de Brasilia. Depuis cette date, ce dispositif de surveillance a permis d'identifier les sérotypes d'un total de 29 cas, montrant une importante prédominance du sérotype DEN-1 (20/29 cas) sur le sérotype DEN-2. Tous ces isolements de dengue effectués dans le DF correspondaient à des cas importés, à l'exception d'un seul cas de DEN-2 isolé en 1991 et dont l'infection est restée d'origine inconnue (22). Le présent travail relate les isolements du sérotype DEN-3, nouveau pour le DF.

Photo 1.

Aspect normal monocellulaire d'une culture de cellules C6/36 clonées de *Stegomyia albopicta* entretenue sur milieu L-15 de Leibovitz (Gibco®).
Normal monocellular aspect of a culture of C6/36 cloned cells of Stegomyia albopicta *preserved in Leibovitz L-15 medium(Gibco®).*

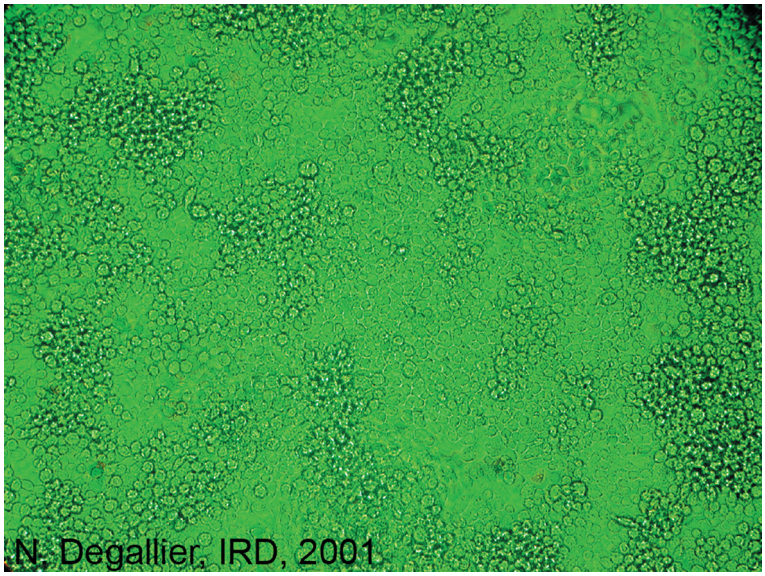
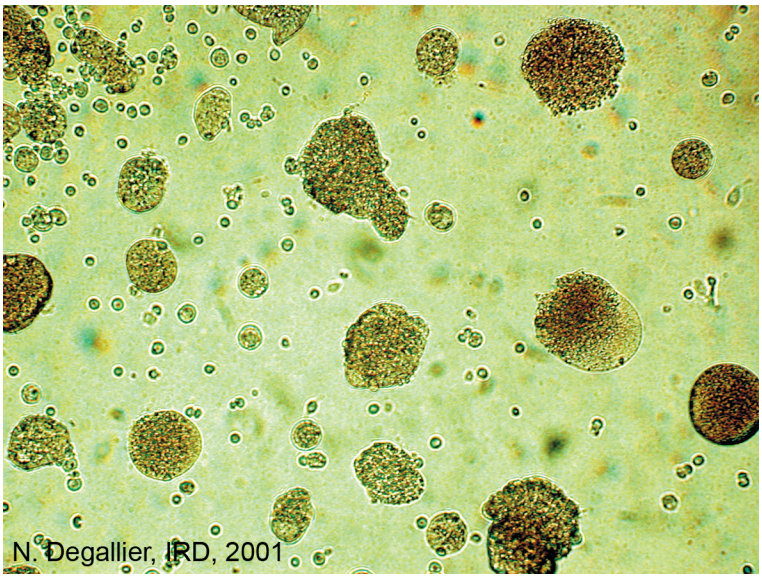


Photo 2

Aspect pathogène de la culture C6/36 qui n'est plus homogène à cause de l'effet syncitial provoqué par l'infection virale.
Pathogenic aspect of the C6/36 culture no more homogenous because of the syncitial effect induced by viral infection.



Matériel et méthodes

Le laboratoire de virologie du LACEN reçoit des prélèvements de sang récoltés sur des malades suspects de dengue dans tout le DF, provenant de la surveillance ou du dépistage réalisé par 72 structures de santé publique et 8 structures de santé privées. Deux types de prélèvements de sang sont effectués, l'un sur anticoagulant dans un cryotube de 1,5 ml et l'autre dans un tube sec. Cette prise de sang peut être effectuée jusqu'au 5e jour après le début des symptômes cliniques. Les prélèvements sont aussitôt expédiés au LACEN sur de la glace dans un conteneur isotherme et, à leur réception, sont conservés à moins 70 °C jusqu'à leur traitement par le laboratoire de virologie.

Les prélèvements en tube sec servent à extraire le sérum pour effectuer des sérologies avec la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) qui utilise un sérum immun réagissant avec les quatre sérotypes du virus de la dengue. Pour cette IFI, on utilise des lames de verre comportant des emplacements pour déposer le sérum. La fixation sur ces lames s'effectue avec de l'acétone à froid pendant 10 minutes. Le sérum immun polyvalent utilisé est fabriqué et commercialisé par le Centre national de référence pour la dengue à l'Institut Evandro-Chagas à Belém (Pará, Brésil).

Le prélèvement sur anticoagulant va servir à inoculer des cultures *in vitro* de cellules C6/36 clonées de *St. albopicta* (23) dans le but d'un isolement viral (15). Cette lignée cellulaire est entretenue au laboratoire par repiquages hebdomadaires dans des flacons stériles comportant une surface de croissance de 25 cm² et du milieu L-15 de Leibovitz (Gibco® BRL, Life Technologies) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Pour rechercher la présence du virus de la dengue dans le prélèvement de sang, les cellules C6/36 sont distribuées en boites plates stériles à usage unique pour cultures cellulaires et contenant 96 puits. Un volume de 100 µl de milieu de culture est distribué dans chacun des puits et les plaques sont mises à incuber à 28 °C. Après 48 heures, lorsqu'une couche monocellulaire s'est développée, le milieu de culture est changé pour du milieu L-15 ne contenant plus que 2 % de SVF. Un volume de 5 µl du sang total est distribué dans chacun des puits (en utilisant deux puits pour chaque patient). Après sept jours d'incubation à température ambiante, des cellules sont prélevées dans chacun des puits et tous les prélèvements mis en culture sont examinés en IFI avec un anticorps spécifique des *Flavivirus*. Toutes les cultures C6/36 trouvées positives sont reprises en IFI spécifique, en utilisant, cette fois-ci, des anticorps monoclonaux spécifiques des sérotypes 1 à 4 pour identifier le virus isolé par la culture (12).

Le sérotype identifié en culture C6/36 est ensuite confirmé par la technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) selon le protocole de Lanciotti *et al.*(16). L'extraction de l'ARN a été effectuée avec du Trizol LS (Gibco®), en utilisant le même échantillon de sang total

(cryopréservé) qui a permis l'isolement viral en culture *in vitro*. Les différents sérotypes sont identifiés à partir de la bande de migration révélée après électrophorèse en gel d'agarose et coloration par du bromure d'éthydium (16). Pour DEN-1, cette bande correspond à 482 paires de bases (pb), pour DEN-2 à 119 pb, pour DEN-3 à 290 pb et pour DEN-4 à 392 pb.

Résultats

C'est entre janvier et avril 1997 que l'on a identifié les premiers cas autochtones de dengue dans le District fédéral, causés par les sérotypes DEN-1 et DEN-2 (8). En avril 1998, le sérotype DEN-1 a été isolé pour la première fois et à trois reprises dans des lots de femelles de *St. aegypti* récoltées dans les maisons de cas de dengue confirmés (6), démontrant de ce fait la transmission de ce sérotype dans le DF.

En 2002, 2 411 prélévements, dont 92 % distribués entre janvier et avril, correspondant à la période pluvieuse, ont été réalisés chez des sujets malades pour une recherche de virus dengue dans le sang (tableau I). Un total de 118 (4,9 %) échantillons étaient positifs, dont respectivement 107 (90,6 %), 5 (4,2 %) et 6 (5,1 %) pour les virus DEN-1, DEN-2 et DEN-3. Les souches de virus DEN-1 provenaient toutes des cas autochtones, alors que les virus DEN-2 étaient soit autochtones, soit importés.

Les six malades suspects chez lesquels a été isolé le sérotype DEN-3 appartenaient aux deux sexes et leur âge allait de 26 à 59 ans. L'un d'entre eux était le premier cas autochtone du DF, les autres ayant récemment voyagé à Rio de Janeiro et dans l'Etat de Bahia (tableau II). Ce premier cas d'infection autochtone par le sérotype DEN-3 a été isolé et identifié sur culture cellulaire C6/36 et la confirmation de cette infection a été effectuée en RT-PCR.

L'année suivante, le LACEN a réalisé 1 039 tentatives d'isolement viral à partir de prélévements provenant du réseau hospitalier de Brasília. Vingt cinq souches (2,4 %) ont été isolées dont 8 (32 %) DEN-1 et 17 (68 %) DEN-3. Cinq cas causés par le virus DEN-3 ont été classés comme autochtones, les patients n'ayant relaté aucune sortie récente du DF (tableau II).

En 2004, l'inoculation de 536 prélévements a permis d'isoler 7 souches (1,3 %), dont respectivement 3 (43 %) et 4 (57 %) appartenaient aux sérotypes DEN-1 et DEN-3.

La technique de RT-PCR, appliquée aux isolements de DEN-3 de 2002 et 2003, a permis de confirmer les identifications réalisées à l'aide des anticorps monoclonaux.

Discussion

L'infection d'un sujet par un quelconque des quatre différents sérotypes de la dengue ne protège pas contre une infection ultérieure et la population s'immunise progressivement, parfois de manière silencieuse, envers les souches virales en circulation (30). L'apparition du sérotype DEN-3 est un facteur augmentant la fréquence des cas de dengue hémorragique (9, 10) et l'introduction de ce nouveau sérotype dans une population où les autres sérotypes ont déjà circulé est un facteur sérieux de risque d'apparition des formes graves de cette arbovirose (11,13, 21).

Actuellement, la propagation de la dengue est grandement facilitée par l'importance et la rapidité des transports aériens et terrestres et le virus peut être transporté facilement d'une ville à une autre, d'un État à un autre, le plus souvent dans le sang des sujets virémiques. La possibilité existe aussi qu'un vecteur soit transporté en conteneur (aérien ou terrestre) et qu'il soit infectieux. Le DF reçoit sans interruption un grand contingent de voyageurs de tous les États du Brésil, mais aussi en provenance d'autres pays, et c'est à partir d'un cas fébrile en provenance d'Angola que le sérotype DEN-2 a été isolé pour la première fois au Brésil (32). Il a été démontré que le génotype du virus DEN-3 qui circule au Brésil correspond au génotype du virus DEN-3, qui est présent dans le nord de L'Amérique du Sud et les Caraïbes (10, 33),

Ces observations épidémiologiques montrent que la capitale du Brésil est un point de départ important de la dispersion de nouveaux sérotypes dans l'intérieur du pays. Le sérotype DEN-1 a montré sa capacité de dispersion dans l'intérieur du pays (épidémies des régions du centre du Brésil en 1990), quatre ans après son endémisation dans les régions côtières en 1986-87 (4). De même, les isolements des premiers cas autochtones de DEN-2 comme de DEN-3 ont toujours eu lieu dans l'État de Rio de Janeiro et ces souches virales ont diffusé ensuite dans deux directions, vers le nord (1) et

Tableau I.

Isolement du virus de la dengue et fréquence des sérotypes chez des cas suspects hospitalisés dans l'État du DF de 2002 à 2004.
Isolation of Dengue virus serotypes from human cases hospitalized in the FD from 2002 to 2004.

	2002 (2411)		2003 (1039)		2004 (536)	
sérotype	**nb**	**%**	**nb**	**%**	**nb**	**%**
DEN-1	107	90,6	8	32	3	43
DEN-2	5	4,2				
DEN-3	6	5,0	17	68	4	57
total	**118**		**25**		**7**	

(le nombre total de prélévements inoculés est indiqué après l'année)

Tableau II.

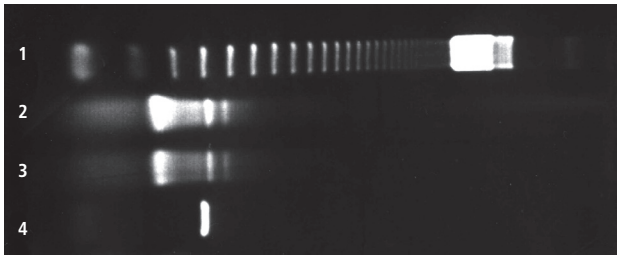
Origine des sérotypes DEN-3 isolés chez des suspects hospitalisés dans le District fédéral de 2002 à 2004 et localisation des premiers cas autochtones (source : LACEN-DF et DIVEP-DF).
Origin of the strains of Dengue 3 serotypes, isolated from human cases hospitalized in the FD from 2002 to 2004, and localization of the autochthonous cases (data from LACEN-DF and DIVEP-DF).

cas n°	date du début des symptômes	date du prélévement	lieu de résidence (ville-état)	origine de l'infection (ville-état)
1	2002	09/01/02	Brasília-DF	Rio de Janeiro-RJ
2	2002	14/01/02	Plano Piloto-DF	Rio de Janeiro-RJ
3	2002	06/02/02	Gama-DF	Rio de Janeiro-RJ
4	2002	19/02/02	Plano Piloto-DF	NC-BA
5	2002	22/02/02	Plano Piloto-DF	Rio de Janeiro-RJ
6	2002	22/02/02	Guará-DF	Rio de Janeiro-RJ
1	20/01/03	22/01/03	Samambaia-DF	Palmas-TO
2	**15/02/03**	**18/02/03**	**Guará-DF**	**Guará-DF**
3	19/02/03	19/02/03	Paranoá-DF	Luziânia-GO
4	03/02/03	05/02/03	Luziânia-GO	Luziânia-GO
5	**03/02/03**	**05/02/03**	**Paranoá-DF**	**Paranoá-DF**
6	**25/02/03**	**25/02/03**	**São Sebastião-DF**	**São Sebastião-DF**
7	**21/02/03**	**25/02/03**	**São Sebastião-DF**	**São Sebastião-DF**
8	11/02/03	13/02/03	Paranoá-DF	NC-BA
9	**05/03/03**	**10/03/03**	**Paranoá-DF**	**Paranoá-DF**
10	26/03/03	28/03/03	Luziânia-GO	Luziânia-GO
11	2003	12/02/03	Palmas-TO	NC-TO
12	2003	12/03/03	Araguaína-TO	NC-TO
13	2003	02/04/03	Colinas-TO	NC-TO
14	2003	09/04/03	Araguaína-TO	NC-TO
15	2003	27/07/03	Colinas-TO	NC-TO
16	2003	23/10/03	Araguaína-TO	NC-TO
17	2003	NC	NC	NC
1	2004	17/03/04	Sobradinho-DF	NC
2	2004	01/04/04	Tocantinópolis-TO	NC-TO
3	2004	16/04/04	Gama-DF	NC
4	2004	23/04/04	Taguatinga-DF	NC

les premiers cas autochtones apparaissent en caractères gras
NC = non communiqué
BA = Bahia
DF = District fédéral
GO = Goías
RJ = Rio de Janeiro
TO = Tocantins

Photo 3.

Caractérisation du sérotype DEN-3 en gel d'agarose par « reverse transcriptase-chain reaction » (RT-PCR). Photographie du gel d'agarose coloré par du bromure d'éthydium
Characterization of the DEN-3 serotype in agarose gel by "reverse transcriptase chain reaction" (RT-PCR). Photography of the agarose gel colored by ethydium bromide.



bande 1 : marqueur de poids moléculaire bp-DNA Leader (Gibco®) ; bandes 2 et 3 : résultats de la RT-PCR correspondant à 290 bp de deux prélèvements de sang total trouvé positifs avec le sérotype DEN-3 ; bande 4 : résultat de la RT-PCR correspondant à 482 bp d'un prélèvement de sang total trouvé positif avec le sérotype DEN-1(JMS Teixeira©LACEN, 2002).

vers l'ouest (34). La première épidémie causée par le sérotype DEN-2 s'est déclarée sur le littoral brésilien (Rio de Janeiro en 1990-91) et elle fut caractérisée par l'apparition de cas hémorragiques.

L'apparition d'un nouveau sérotype est également envisageable et la souche DEN-4 n'a pas été retrouvée au Brésil depuis l'épidémie de Boa Vista, Roraima en 1982 (4). La plus forte proportion mensuelle de cas de dengue est toujours observée pendant les mois de février à mars, en fin de saison des pluies où la population de *St. aegypti* est à son maximum. Cette période correspond aussi à la période maximale de déplacement des populations à l'intérieur du pays pendant les fêtes du carnaval qui provoquent toujours une forte concentration de personnes et de touristes venus de toutes parts (27).

Malgré la mise en évidence du sérotype DEN-3 chez des malades infectés hors du DF en 2002, puis la démonstration d'une transmission autochtone du même sérotype en 2003, il semblerait qu'il ne soit pas durablement installé, puisqu'en 2004 aucun cas autochtone n'a été confirmé. Par ailleurs, ce sérotype ayant causé des formes hémorragiques de la maladie dans d'autres régions n'en a pas causé dans le DF. Au moins trois hypothèses non exclusives l'une de l'autre peuvent expliquer ce phénomène: une virulence faible des souches introduites, une efficacité accrue du contrôle vectoriel et des modifications environnementales ayant induit une diminuition de la capacité vectorielle de *St. aegypti* pour ce sérotype.

Conclusion

Le dépistage en laboratoire des sérotypes de dengue circulant dans le DF reste cependant indispensable et se doit d'être organisé et efficace au niveau de l'acheminement des prélèvements. Le diagnostic virologique reste le seul moyen fiable pour observer les modifications de prédominance entre les différents sérotypes en circulation.

Cette surveillance devrait favoriser des actions précoces d'intervention, que ce soit au niveau de la lutte antivectorielle ou de la préparation des équipes de santé dans les structures hospitalières. Avec cette apparition datée et confirmée du sérotype DEN-3 autochtone dans le DF, une attention particulière doit être maintenue concernant l'apparition de formes cliniques graves. Des études moléculaires permettront de relier d'éventuelles variations de virulence de ces souches à leur diversité génétique.

Remerciements

Ce travail a bénéficié de l'aide financière des organismes suivants : Fundação Nacional da Saúde – Ministério da Saúde (FUNASA-MS) ; Laboratório central do District fédéral – Secretaria estadual da Saúde (LACEN-SES) ; Diretoria de vigilância ambiental – Secretaria de Estado da Saúde (DIVAL-SES), Brasília DF, Brésil ; Institut de recherche pour le développement (IRD, UMR182 / UR178), Paris, France. Nous sommes redevables à la Diretoria de vigilância epidemiológica (DIVEP-SES) du District fédéral pour les informations épidémiologiques concernant les cas de dengue.

Références bibliographiques

1. ARAÚJO TPD, RODRIGUES SG, COSTA MIW DA, VASCONCELOS PF DA C & TRAVASSOS DA ROSA APA – Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos no Estado do Pará, Brasil, 1999. *Rev Soc bras Med Trop*, 2002, **35**, 579-584.
2. BRISEÑO-GARCÍA B, GÓMEZ-DANTÉS H, ARGOTT-RAMÍREZ E, MONTESANO R, VÁZQUEZ-MARTÍNEZ AL *et al.* – Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Em inf Dis*, 1996, **2**, 133-135.
3. CUNHA RV, SCHATZMAYR HG, MIAGOSTOVICH MP, BARBOSA AMA, PAIVA FG *et al.* – Dengue epidemic in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, in 1997. *Trans Roy Soc trop Med Hyg* , 1999, **93**, 247-249.
4. DEGALLIER N, HERVÉ J-P, TRAVASSOS DA ROSA APA, TRAVASSOS DA ROSA ES, VASCONCELOS PFC *et al.* – Entomological studies on Dengue fever vectors in Brazil: the epidemics of Boa Vista, Roraima, 1982, Niteroi, Rio de Janeiro, 1986, and Ceara State, 1986, 1994. In: TRAVASSOS DA ROSA APA, VASCONCELOS PFC & TRAVASSOS DA ROSA JFS (Eds), *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Instituto Evandro Chagas, Belem, Pará, 1998, pp. 261-271.
5. DEGALLIER N, TEIXEIRA JMS, SOARES SDS, PEREIRA RD, PINTO SCF *et al.* – *Aedes albopictus* may not be transmitting Dengue virus to man during epidemics in Brazil. *Rev Saúde Públ*, 2003, **37**, 386-387.
6. DEGALLIER N, TEIXEIRA JMS, VILARINHOS P DE TR, PINTO SCF & PEREIRA RD – First isolation of dengue 1 virus from *Aedes aegypti* in Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2000, **33**, 95-96.
7. DEGALLIER N, TRAVASSOS DA ROSA APA, VASCONCELOS PF DA C, FIGUEIREDO LTM, TRAVASSOS DA ROSA JFS *et al.* – La dengue et ses vecteurs au Brésil. *Bull Soc Pathol Exot*, 1996, **89**, 128-136.
8. DEGALLIER N, VILARINHOS P DE TR & DUSI RM – Aspectos eco-epidemiológicos da Dengue e do *Aedes aegypti* no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Inst Saúde D F*, 1998, **9**, 67-71.
9. FAURAN P – Nouveaux aspects épidémiologiques de la dengue. *Bull Soc Pathol Exot*, 1996, **89**, 163-165.
10. FIGUEROA R & RAMOS C – Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch Med Res*, 2000, **31**, 429-430.
11. GUBLER DJ – Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, 2002, **10**, 100-103.
12. GUBLER DJ, KUNO G, SATHER GE, VELEZ M & OLIVER A – Mosquito cell cultures and monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Amer J Trop Med Hyg*, 1984, **33**, 158-165.
13. GUZMAN MG & KOURI G – Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*, 2003, **27**, 1-13.
14. GUZMÁN MG, VÁSQUEZ S, MARTÍNEZ E, ÁLVAREZ M, RODRÍGUEZ R *et al.* – Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Pan Amer J Publ Hlth*, 1997, **1**, 193-199.
15. IGARASHI A – Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*, 1978, **40**, 531-544.
16. LANCIOTTI RS, CALISHER CH, GUBLER DJ, CHANG GJ & 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.

17. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, HONÓRIO NA, CASTRO MG, SCHATZMAYR HG, MIAGOSTOVICH MP *et al.* – Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Osw Cruz*, 2002, **97**, 799-800.
18. NOGUEIRA RMR, MIAGOSTOVICH MP, FILIPPIS AMBD, PEREIRA MAS & SCHATZMAYR HG – Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Osw Cruz*, 2001, **96**, 925-926.
19. NOGUEIRA RMR, MIAGOSTOVICH MP & SCHATZMAYR HG – Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saúde Públ*, 2000, **16**, 205-211.
20. OSANAI CH, TRAVASSOS DA ROSA APA, TANG AT, AMARAL RS, PASSOS ADC *et al.* – Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. Nota prévia. *Rev Inst Med trop São Paulo*, 1983, **25**, 53-54.
21. PASSOS MNP, SANTOS LMJG, PEREIRA MRR, CASALI CG, FORTES BDPMD *et al.* – Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2004, **37**, 293-295.
22. PIRES MFC, TEIXEIRA JMS, SILVA NC & CÂMARA GNL – Investigation on dengue in Distrito Federal, Brazil. In: SBV (Ed) Virológica 91. *II Simpósio Internacional sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres hemorrágicas 17 a 23 de novembro de 1991 CENTUR (Fundação Cultural Tancredo Neves) Belém, Pará, Brasil. Apresentação de resumos.* IEC/FNS, UFPA, Sociedade Brasileira de Virologia, Belém, Pará, 1991, p. 2.
23. REINERT JF & HARBACH RE – Generic and subgeneric status of aedine mosquito species (*Diptera : Culicidae : Aedini*) occurring in the Australasian Region. *Zootaxa*, 2005, 1-10.
24. REINERT JF, HARBACH RE & KITCHING IJ – Phylogeny and classification of Aedini (*Diptera : Culicidae*), based on morphological characters of all life stages. *Zool J L Soc*, 2004, **142**, 289-368.
25. ROCCO IG, KAVAKAMA BB & SANTOS CLS – First isolation of Dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2001, **43**, 55-57.
26. SCHATZMAYR HG – Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Osw Cruz*, 2000, **95**, 179-181.
27. SIMONE TSD, NOGUEIRA RMR, ARAÚJO ESM, GUIMARÃES FR, SANTOS FB et al. – Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2004, **98**, 553-562.
28. TAUIL PL – Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Públ*, 2001, **17**, 99-102.
29. TDR – *Tropical disease research: progress 2001-2002. Sixteenth programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special programme for research & training in tropical diseases.* TDR/GEN/03.1. OMS, Genève, 2003, vi + 86 pp.
30. TEIXEIRA MDG, BARRETO ML, COSTA MDCN, FERREIRA LDA, VASCONCELOS PFC *et al.* – Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med & Int Hlth*, 2002, **7**, 757-762.
31. TRAVASSOS DA ROSA APA, VASCONCELOS PFC, TRAVASSOS DA ROSA ES, RODRIGUES SG, MONDET B *et al.* – Dengue epidemic in Belém, Pará, Brazil, 1996-97. *Em Inf Dis*, 2000, **6**, 298-301.
32. TRAVASSOS DA ROSA APA, VASCONCELOS PF DA C, TRAVASSOS DA ROSA JFS & GUERREIRO SC – Primeiro isolamento do vírus dengue 2 no Brasil a partir de um caso oriundo de Luanda, Angola. In: SBV (Ed), Virológica 89, *I Encontro Regional Sul de Virologia, 9 a 13 de outubro, Anais.* Florianópolis SC, 1989, p. 15.
33. UZCATEGUI NY, COMACH G, CAMACHO D, SALCEDO M, CABELLO DE QUINTANA M *et al.* – Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J gen Virol*, 2003, **84**, 1569-1575.
34. VASCONCELOS PF DA C, TRAVASSOS DA ROSA ES, TRAVASSOS DA ROSA JFS, FREITAS RBD, DEGALLIER N *et al.* – Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1993, **35**, 141-148.