



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA  
DOS VÍRUS DENGUE NO ESTADO DO AMAZONAS,  
BRASIL.**

**REGINA MARIA PINTO DE FIGUEIREDO**

**Manaus**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA  
DOS VÍRUS DENGUE NO ESTADO DO AMAZONAS,  
BRASIL.**

**REGINA MARIA PINTO DE FIGUEIREDO**

Manaus,

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**REGINA MARIA PINTO DE FIGUEIREDO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA  
DOS VÍRUS DENGUE NO ESTADO DO AMAZONAS,  
BRASIL.**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal  
do Amazonas, como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Biotecnologia, área de  
concentração em saúde.**

**Orientadora: Prof<sup>da</sup> Dr<sup>a</sup> Izeni Pires Farias  
Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Felipe Gomes Naveca**

**Manaus  
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Figueiredo, Regina Maria P.

Caracterização molecular e epidemiológica dos vírus dengue no Estado do Amazonas, Brasil/ Regina M. P. Figueiredo/ Manaus- UFAM, 2007.

XVII-114

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Amazonas

Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Izeni Pires Farias.

Palavras-chave: 1.Dengue 2. sorotipo 3. RT- PCR.

I. Figueiredo, RMP.

II. Título: Dengue.

### **Apresentação**

Esta tese foi desenvolvida na Gerência de Virologia/Laboratório de Arbovirologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), sendo financiada pelo recurso do projeto **Caracterização molecular e evolutiva dos vírus dengue no Estado do Amazonas**, financiado pelo CNPq.

**REGINA MARIA PINTO DE FIGUEIREDO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DOS VÍRUS DENGUE  
NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em saúde.

Aprovada em 29 de Janeiro de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Izeni Pires Farias, Presidente  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Profa. Dra. Adriana Malheiros  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Paulo José Benevides dos Santos  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

A minha amiga Dra. Betsy Dutary Thatcher que iniciou os estudos sobre dengue no Amazonas, pelos exemplos de trabalho e ética, que contribuíram para minha formação e realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me ajudou a enfrentar todos os obstáculos.

A Universidade Federal do Amazonas - UFAM, ao Programa de Doutorado Multidisciplinar em Biotecnologia pela possibilidade de realizar o curso de pós-graduação.

A Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM pela possibilidade de realizar este trabalho.

A Universidade de Porto Rico pelo seqüenciamento das amostras.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA na pessoa do Dr. Cristóvão Alves Costa que gentilmente cedeu o Laboratório de Virologia para a realização de parte deste trabalho, pelo apoio e atenção com que sempre me recebeu.

A Dra. Izeni Pires Farias, pela orientação em todas as etapas deste trabalho, seu caráter e bons exemplos contribuíram para minha formação e conclusão deste trabalho, por seu apoio científico e humano e confiança depositada em mim e neste projeto.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca, pela sua amizade e atenção com que sempre me atendeu, por sua brilhante contribuição científica, mas, sobretudo por sua confiança em mim e nos resultados apresentados neste estudo, seu apoio, confiança e sinceridade foram fundamentais para finalização deste estudo.

A Dra. Michele de Souza Bastos pela brilhante contribuição técnica, pelo apoio não somente científico mais pela sua amizade e presença ao meu lado em todos os momentos deste trabalho.

A Dra. Cíntia Mara de Oliveira sua orientação científica foram fundamentais para a padronização das técnicas usada neste trabalho, por sua amizade, generosidade e atenção com que sempre me recebeu.

Ao Professor e amigo Dr. Edmar Vaz de Andrade pela atenção, carinho e amizade com que sempre me recebeu, por suas palavras de incentivo e apoio que tanto me ajudaram nos momentos de dificuldade.

A Dra. Julita Câmara Nascimento, por sua contribuição durante as coletas das amostras biológicas usadas neste trabalho, pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. João Bosco Gimaque por sua contribuição na realização dos testes sorológicos.

A Dra. Maria Paula Gomes Mourão por ter cedido amostras de seu projeto para que eu iniciasse este estudo, pelo apoio em momentos importantes deste projeto.

Aos estagiários hoje meus queridos amigos, Miriam Nascimento, Suziane Viana, Evalino Ferreira e, Cassiano Junior pelo apoio técnico, mas, sobretudo pela amizade sincera.

Aos meus amigos Dr. Luís Lozano e Dra. Marilaine Martins pela amizade, palavras de incentivo e apoio durante estes anos.

Ao Dr. José Camilo pelas correções e sugestões.

A meu amigo José Elias Bindá sempre torcendo por mim, sei que estou presente em todas suas orações.

A todos os colegas da Gerência de Virologia da FMTAM pelo apoio e incentivo.

A minha irmã Rita e meus sobrinhos Cláudia e Carlinhos, pela amizade e apoio incondicionais.

Aos meus pais Maria Silvia e *in memoriam* José Torres por suas lições de generosidade, respeito ao próximo e dedicação ao trabalho que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível a realização deste estudo.

## RESUMO

A infecção pelo vírus dengue aumentou significativamente no Brasil durante a última década, particularmente depois de 1994, como consequência da disseminação do *Aedes aegypti*. A dispersão do vetor foi seguida pela introdução dos sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 nas principais cidades brasileiras e a co-circulação de diferentes sorotipos permitiu o surgimento dos primeiros casos de dengue hemorrágico (DHF). Este estudo teve como objetivos: Isolar em cultura de células amostras dos vírus dengue circulantes no Estado do Amazonas; identificar os sorotipos do vírus dengue por meio de técnicas sorológicas e moleculares; correlacionar os aspectos clínicos e laboratoriais mais importantes dos casos de dengue, febre hemorrágica do dengue (DHF) e da síndrome de choque por dengue (DSS), com cada sorotipo e comparar os resultados obtidos por seqüenciamento parcial dos genes C e prM das amostras de dengue encontradas neste estudo em comparação com seqüências depositadas no GenBank. Entre janeiro de 2005 e junho de 2007, 534 amostras de sangue foram coletadas de pacientes com sintomas clínicos de dengue e negativos para malária. Anticorpos específicos anti-dengue (IgM) foram detectados em 90 (16,8%) amostras, dessas 40 (44,4%) foram amplificadas, 13 (32,5%) foram tipadas como DEN-2, 23 (57,5%) como DEN-3 e 4 (10%) como DEN-4. Entre as 40 amostras positivas por PCR, 52 (57,7%) foram também positivas no isolamento viral. DEN-3 foi isolado de dois pacientes diagnosticados com DHF pelos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS). No presente trabalho foi também registrada a primeira detecção de DEN-4 no Amazonas. O sorotipo DEN-4 foi identificado em três casos de co- infecção, dois deles foram co- infecções de DEN-3/DEN-4 e um DEN-2 / DEN-4. Foi observada uma incidência de DEN-3 em relação ao DEN-2 e DEN-4, e a ausência da circulação de DEN-1.

Palavras chave: Dengue; sorotipo; RT- PCR.

**ABSTRAT**

Dengue virus infection increased significantly in Brazil during the last decade, particularly after 1994, as a consequence of *Aedes aegypti* dissemination. Vector dispersion was followed by the introduction of DEN-1, DEN-2 and DEN-3 serotypes in major Brazilian cities and the co-circulation of different serotypes has led to the first cases of dengue hemorrhagic fever (DHF). This study had as objectives: Isolate in cell culture samples of dengue virus circulating in the state of Amazonas; identify the serotypes of the dengue virus through sorologicas and molecular techniques; to correlate the clinical and laboratory most important cases of dengue, of dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue by shock syndrome (DSS), with each serotype; comparing the results obtained through the sequencing parcial of genes C and prM of samples of dengue found in this study compared with the sequences deposited in GenBank. Between January 2005 and June 2007, 534 blood samples were collected from patients with clinical symptoms of dengue fever who were negative for malaria. Anti-dengue immunoglobulin M (IgM) specific antibodies were detected in 90 (16.8%) samples, from those 40 (44.4%) were PCR-amplified, 13 (32.5%) were typed as DEN-2, 23 (57.5%) as DEN-3 and 4 (10%) as DEN-4. Among the 40 PCR-positive samples, 52 (57,7%) were also positive for viral culture. DEN-3 was isolated from two patients diagnosed with hemorrhagic fever by the WHO criteria. As this work reports the first detection of dengue type 4 viruses in Amazonas, DEN-4 was identified from the sera of three patients with co- infection two of them were DEN-3/DEN-4 co-infection and one DEN-2 / DEN-4. A greater incidence of DEN-3 in relation to DEN-2 and DEN-4, and the absence of DEN-1 circulation.

Keywords: Dengue; serotype; RT- PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Casos de dengue clássico notificado no Amazonas no período de janeiro de 1998 a novembro de 2007.....	41
Figura 2	Casos de dengue hemorrágico notificado no Amazonas .....	42
Figura 3	Genoma do vírus dengue.....	45
Figura 4.	Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA modelo Neighbour-joining. * indivíduo AM2112 com caso de Dengue 3, 4 e Recombinante; ** indivíduo 750 com caso de Dengue 3 e 4. Os valores acima dos braços são valores de <i>bootstrap</i> , foram considerados os valores acima de 50%.....	78
Figura 5.	Detecção de co- infecção (DEN-3/DEN-4), DEN-3 e DEN-4 em gel de agarose. Linhas 1 e 9: Padrão de peso molecular (Invitrogen) 1 Kb; Linha 2: AM750 multiplex-PCR; Linha 3: AM750 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 4: AM750 PCR com iniciador para DEN-3; Linha 5: AM1041 multiplex-PCR; Linha 6 AM1041 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 7: AM1619 multiplex- PCR; e Linha 8: AM1619 PCR com iniciador para DEN-4.....	80
Figura 6.	Detecção de DEN-2 e DEN-4 em gel de agarose. Linha 1 : Padrão de peso Molecular (Invitrogen) 100 pb; Linha 2: *AM1619 multiplex-PCR; Linha 3: AM1619 multiplex-PCR; Linha 4: *AM1619 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 5: AM1619 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 6 e 7: AM2112 Com iniciador para DEN-4; Linha 8: Controle Negativo.....	81
Figura 7.	Seqüências alinhadas dos clones positivos para DEN-4.....	83

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1- Amplificação pelo RT-PCR dos vírus dengue segundo os dias de sintomas.....	67
Gráfico 2- Distribuição dos casos de dengue segundo faixa etária em qualquer um dos testes .....	68
Gráfico 3- Distribuição dos sorotipos em cada faixa etária. Amostras testadas pelo RT-PCR e Isolamento Viral.....	69
Gráfico 4-Distribuição dos casos positivos de dengue segundo o gênero, em qualquer um dos testes.....	70
Gráfico 5 - Sintomas observados nos casos de dengue em qualquer um dos testes.....	73
Gráfico 6- Comparação entre os sintomas apresentados por pacientes infectados pelos sorotipos DEN-2, DEN-3 e DEN-4.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Reagentes utilizados na reação de Nested – PCR.....	58
Tabela 2-	Iniciadores usados para amplificação dos vírus dengue.....	61
Tabela 3-	Pares de iniciadores usados no 1º PCR e na reação Nested PCR.....	62
Tabela 4-	Amostras testadas pelos métodos ELISA, RT-PCR e Isolamento Viral, positivas.....	64
Tabela 5-	Total de amostras testadas pelos métodos RT-PCR e Isolamento Viral, positivas.....	66
Tabela 6-	Amostras de pacientes que não retornaram para a segunda coleta ou que foram negativos no teste ELISA.....	66
Tabela 7-	Distribuição dos casos de dengue segundo as zonas de residência.....	71
Tabela 8-	Pacientes positivos para dengue por ELISA, RT-PCR e Isolamento Viral que estiveram em diferentes localidades.....	72
Tabela 9-	Distância genética (Distância <i>P</i> não corrigida) com desvio padrão (valores acima) para cada comparação par a par dos grupos de dengue.....	75
Tabela 10-	Estimativa da razão de substituições de nucleotídeos.....	76
Tabela 11-	Amostras positivas para co – infecção.....	79

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Variantes genotípicas de vírus dengue determinadas através de seqüenciamento parcial do genoma viral.....	50
Quadro 2- Variantes genotípicas de vírus dengue determinadas através da seqüência completa do gene E.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DEN-1</b>	-Dengue 1
<b>DEN-2</b>	-Dengue 2
<b>DEN-3</b>	-Dengue 3
<b>DEN-4</b>	-Dengue 4
<b>OMS</b>	-Organização Mundial de Saúde
<b>FMTAM</b>	-Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
<b>DF</b>	-Febre clássica do dengue
<b>DHF</b>	-Febre hemorrágica do dengue
<b>DSS</b>	-Síndrome de choque por dengue
<b>WHO</b>	-World Health Organization
<b>IgG</b>	-Antimunoglobulina IgG humana
<b>IgM</b>	-Antimunoglobulina IgM humana
<b>MAC-ELISA</b>	-Enzyme-linked – immunoabsorbent assay
<b>RT</b>	-Transcrição reversa
<b>PCR</b>	-Reação em cadeia da polimerase
<b>C</b>	-Gene que codifica a proteína do capsídeo
<b>prM</b>	-Gene que codifica a proteína precursora de membrana
<b>E</b>	-Gene que codifica a proteína de envelope
<b>NS1, 2A,2B,3,4A, 4B, e 5:</b>	-Genes que codificam as proteínas não estruturais 1, 2A, 2B, 3, 4 A, 4B E 5, respectivamente.
<b>RNA</b>	-Ácido ribonucléico
<b>Taq DNA polimerase</b>	-Enzima DNA polimerase extraída do <i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>dNTP</b>	-Desoxinucleotídeo trifosfato
<b>free Rnase</b>	-Livre de enzimas Rnases
<b>DNA</b>	-Ácido desoxirribonucléico
<b>cDNA</b>	-DNA complementar
<b>TBE</b>	-Tampão de Tris HCL, EDTA e ácido bórico
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	-Sulfato de magnésio
<b>IH</b>	-Inibição da Hemaglutinação
<b>SVS</b>	-Secretaria de Vigilância em Saúde
<b>ASP</b>	-Ácido aspártico
<b>HIS</b>	-Histidina

## SUMÁRIO

<b>Introdução.....</b>	<b>18</b>
Justificativa.....	19
<b>Objetivos.....</b>	<b>20</b>
2.Referencial Teórico.....	22
2.1 Etiologia.....	23
2.2 Espectro Clínico.....	23
2.3 Hipótese integral para o desenvolvimento de DHF.....	25
2.4 Transmissão e vetor.....	26
2.5 Ciclos de Transmissão.....	28
2.6 Co- infecção e Recombinação.....	28
2.7 Diagnóstico laboratorial.....	30
2.8 Epidemiologia.....	32
2.9 Estudos Moleculares dos Vírus Dengue.....	42
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>54</b>
3.1 Coleta de Material.....	54
3.2 Diagnóstico Sorológico.....	55
3.3 Diagnóstico Viroológico.....	55
3.4 Extração do RNA.....	57
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) conjugada a transcrição reversa (RTPCR).....	57
3.6 Iniciadores.....	61
3.7 Seqüenciamento.....	63
3.8 Clonagem.....	63
3.9 Análise Filogenética.....	63
<b>4 Resultados.....</b>	<b>64</b>
4.1 Análises Laboratoriais e Epidemiológicas.....	64
4.1.1 Distribuição dos casos segundo a faixa etária e gênero.....	68
4.1.2 Distribuição dos casos segundo as zonas de residência.....	71
4.2 Análises Genéticas.....	75
4.2.1 Análises Filogenéticas.....	77
4.2.2 Co–infecção.....	79
4.2.3 Recombinação.....	82
<b>5. Discussão.....</b>	<b>84</b>
5.1 Análises Laboratoriais e Epidemiológicas.....	84
5.2 Identificação pelo isolamento viral e PCR dos vírus X Período de doença .....	85
5.3 Identificação do vírus x Faixa Etária .....	86
5.4 Identificação do vírus x Localização Geográfica .....	87
5.5 Manifestações Clínicas.....	88
5.6 Co–infecção.....	90
5.7 Recombinação.....	92
5.8 Análise Evolutiva.....	94
5.9 Análise Filogenética .....	96
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS</b>	

## INTRODUÇÃO

Os arbovírus são agentes virais transmitidos por insetos e outros vetores. Constituem o maior grupo conhecido de vírus com cerca de 535 membros. Desses, aproximadamente um terço foi isolado na Amazônia, 100 são conhecidos por infectar seres humanos, 40 infectam animais domésticos e pelo menos 10 podem causar epidemias (KARABATSOS, 1985). A dengue é considerada atualmente, a arbovirose mais difundida no mundo e a mais importante doença viral isolada de artrópodes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001), constituindo causa importante de morbidade e mortalidade, resultando em epidemias de impacto em saúde pública. A dengue foi reconhecida em mais de 100 países, e 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde a dengue é endêmica. Estima-se que ocorram, anualmente, 50–100 milhões de casos de febre clássica do dengue (DF) e várias centenas de milhares de febre hemorrágica do dengue (DHF), dependendo da atividade epidêmica. Existe notificação oficial de cerca de 250 000–500 000 casos de DHF; a verdadeira incidência, entretanto, não é completamente conhecida (PINHEIRO, 1997; WHO, 2000).

A doença é endêmica no continente americano, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental, África e Mediterrâneo Oriental, com a maior incidência nas três primeiras regiões. Nos últimos oito anos a incidência da dengue cresceu nas áreas endêmicas, particularmente na região do continente americano; nos três últimos anos, entretanto, a taxa de fatalidade foi mais alta nas regiões do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental (GUZMÁN & KOURI, 2002).

## JUSTIFICATIVA

A localização geográfica da região Amazônica assim como a situação epidemiológica vivida em Manaus faz com que a expectativa de casos mais severos possam ocorrer, devido à circulação dos quatro sorotipos DEN-1 a 4, rápida expansão e disseminação do vetor associado aos modernos meios de transporte. Deve-se levar em conta ainda outros fatores que limitam a prevenção e o controle das epidemias do dengue, entre os quais a falta de uma vacina tetravalente para aplicação em larga escala e, as dificuldades de controle do mosquito vetor cuja proliferação é favorecida devido às precárias condições ambientais dos centros urbanos, a umidade e a temperatura brasileiras, associada à resistência dos ovos do *Aedes aegypti* por um ano ou mais de dessecação (NOGUEIRA et al., 2000).

A competência do vetor *A. aegypti* e sua persistência em áreas urbanas são fatores que dificultam a prevenção dos quatro sorotipos da dengue, atualmente as medidas de controle têm como objetivo somente eliminar o vetor, que é um mosquito bem adaptado a diferentes condições ambientais e ao moderno estilo de vida de diferentes países, especialmente países em desenvolvimento que mantêm nos domicílios os criadouros do vetor.

Em relação às vacinas não há dúvida quanto à necessidade de produção de uma vacina que ofereça imunidade de larga duração contra os quatro sorotipos do vírus. Entretanto, diversos fatores têm impedido a elaboração de vacinas específicas contra o dengue, como a falta de um modelo animal, o conhecimento incompleto de sua patogenia e o financiamento insuficiente para as investigações sobre a dengue (GUZMÁN et al., 2006).

Os dados acima mencionados demonstram a importância de estudos genéticos e do monitoramento, por meio da epidemiologia molecular, das amostras do vírus dengue circulantes no país. A caracterização molecular pode identificar a circulação simultânea das amostras antigenicamente similares, porém geneticamente distintas, e permitir o conhecimento de sua distribuição separadamente.

### **OBJETIVO GERAL**

- Identificação e caracterização dos vírus Dengue circulantes no Estado do Amazonas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar epidemiologicamente a dengue no Estado do Amazonas através de técnicas sorológicas e moleculares.
- Isolar em cultura de células amostras dos vírus dengue circulantes no Estado do Amazonas.
- Identificar os sorotipos do vírus dengue por meio de técnicas sorológicas e moleculares.
- Correlacionar os aspectos clínicos obtidos durante a coleta da amostra de sangue e laboratoriais mais importantes dos casos de Dengue, Febre Hemorrágica do Dengue (DHF) e da Síndrome de Choque por Dengue (DSS), com cada sorotipo.
- Comparar os resultados obtidos por seqüenciamento parcial dos genes C e prM das amostras de dengue encontradas nesse estudo em comparação

com as seqüências depositadas no GenBank afim de inferir dados sobre os genótipos circulantes na população de estudo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O termo dengue, de origem espanhola, foi usado para descrever as dores articulares de uma enfermidade que acometeu os ingleses durante a epidemia que afetou as Índias Ocidentais Espanholas de 1927-1928. Foi trazida para o continente americano a partir do Velho Mundo, com a colonização no final do século XVIII. Entretanto, não é possível afirmar, pelos registros históricos, que as epidemias foram causadas pelos vírus dengue, visto que seus sintomas são similares aos de várias outras infecções, em especial, a febre amarela (HOLMES *et al.*, 1998). A etiologia do dengue já foi creditada aos miasmas, as bactérias, aos protozoários e, finalmente, a um agente ultramicroscópico. Do mesmo modo, a transmissão já foi considerada através de miasmas, da via respiratória e por último, através de mosquitos.

O isolamento dos vírus dengue ocorreu na década de 40 durante as epidemias de Nagasaki (1943) e Osaka (1944), sendo a primeira cepa denominada Mochizuki (KIMURA & HOTTA, 1944). Em 1945, a cepa Havaí foi isolada e, neste mesmo ano ao identificar outro vírus em Nova Guiné, observou-se que essas cepas tinham características antigênicas diferentes e foram considerados sorotipos do mesmo vírus. As duas primeiras cepas foram denominadas sorotipo 1 e a da Nova Guiné sorotipo 2. Em 1956, foram isolados os vírus 3 e 4, definindo-se que o complexo dengue é formado por quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (MARTINEZ-TORRES, 1990).

A variação genética dentro de cada sorotipo foi primeiro demonstrada por meio de técnicas sorológicas, posteriormente por análise do genoma viral foram determinados cinco genótipos ou subtipos para DEN-1, cinco para DEN-2, quatro e dois para DEN-3 e DEN-4, respectivamente (RICO-HESSE, 1990; LANCIOTTI

et al., 1994). A classificação dos genótipos foi revista por Rico-Hesse (2003) por análise e comparação da seqüência nucleotídica completa do gene E de diversas cepas. Como resultado foi sugerido a ocorrência de quatro genótipos para DEN-2 e três para DEN-4. Para DEN-1 e DEN-3 permaneceram cinco e quatro genótipos, respectivamente (CUNHA & NOGUEIRA, 2005).

## **2.1 Etiologia**

Os vírus dengue pertencem a família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, que reúne aproximadamente 80 espécies divididas em oito grupos sorologicamente relacionados (quatro transmitidos por mosquitos, dois por carrapatos e dois sem vetores conhecidos) e um grupo que não se classifica dentro destes sorogrupos (WESTAWAY et al.,1985; LINDENBACH & RICE, 2001). Os quatro sorotipos do vírus dengue são filogeneticamente diferentes e estão mais relacionados com flavivírus transmitidos por mosquitos, estudos indicam que estes vírus surgiram aproximadamente há 1000 anos a partir de um vírus de macaco e sua transmissão ao homem ocorreu nos últimos 320 anos. Alguns estudos indicam sua origem no continente africano e outros na Ásia (WEAVER et al., 2004).

## **2.2 Espectro Clínico**

A dengue apresenta duas formas clínicas principais: a febre clássica do dengue (DF) e a febre hemorrágica do dengue (DHF), com ou sem choque (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1994). A DF apresenta dor de cabeça, dor retroorbital, dores nos ossos ou articulações e nos músculos, erupção cutânea e leucopenia como sintomas. A DHF é caracterizada por febre alta, fenômeno

hemorrágico geralmente com hepatomegalia e, nos casos graves, sinais de insuficiência circulatória. Tais pacientes podem desenvolver um choque hipovolêmico, resultante do extravasamento de plasma. Esse quadro é denominado de síndrome de choque por dengue (DSS) e pode ser fatal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001). A World Health Organization (WHO,1997) definiu a DHF/DSS em quatro categorias, de acordo com a gravidade:

Grau I – Febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva;

Grau II - Além das manifestações constantes do Grau I, soma-se hemorragias espontâneas leves (sangramentos de pele, epistaxe, gengivorragia e outros);

Grau III – Colapso circulatório com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação;

Grau IV - Choque profundo com ausência da pressão arterial e pressão de pulso imperceptível.

Todos os graus da doença são considerados DHF enquanto somente os graus III e IV são considerados DSS. A apresentação de trombocitopenia com hemoconcentração intercorrente diferencia os graus I e II da DHF do dengue clássico com manifestações hemorrágicas. Segundo a WHO (1997), para que o diagnóstico de DHF/DSS seja estabelecido é necessário que o paciente, além do quadro clínico compatível, apresente plaquetometria igual a ou menor do que  $100.000/\text{mm}^3$  e hematócrito aumentado em 20% ou mais em relação ao valor inicial encontrado.

### **2.3 Hipótese integral para o desenvolvimento de DHF.**

A teoria da infecção seqüencial sugere que indivíduos com anticorpos heterólogos antidengue, adquiridos ativa ou passivamente (através da placenta), poderiam apresentar a doença em sua forma clínica mais grave, inclusive com choque. Segundo estes autores isto ocorreria mais freqüentemente quando a segunda infecção fosse causada pelo vírus DEN-2, sobretudo quando o intervalo entre as duas infecções fosse de no mínimo três meses e no máximo cinco anos, e ocorresse em crianças do sexo feminino com mais de três anos de idade (HALSTEAD et al. 1967, HALSTEAD 1970, KLIKS et al. 1988). Segundo esta teoria a etiopatogenia do DH/DSS está centrada na presença de anticorpos heterólogos da classe IgG, existentes em concentrações subneutralizantes, e que formam complexos imunes com os vírus. Quando estes complexos imunes ligam-se a fagócitos mononucleares, através de receptores Fc, eles são rapidamente internalizados, resultando em infecção celular, seguida de replicação viral, isto significa que os anticorpos subneutralizantes impedem a reinfecção pelo mesmo sorotipo que estimulou a sua produção e, paradoxalmente, facilitam a infecção por outros sorotipos (HALSTEAD, 1988).Entretanto, esta teoria não explica a ocorrência de dengue hemorrágico em casos de infecção primária.

Publicou-se em 1987 uma hipótese integral para o desenvolvimento da epidemia de DHF, levando em consideração a experiência cubana e internacional.

A intersecção dos três grupos de fatores (fatores do hospedeiro, viral e epidemiológico) determina a ocorrência de uma epidemia de DHF. Entre os fatores individuais de risco estariam sexo, idade, enfermidades crônicas, preexistência de anticorpos para dengue e a resposta individual do hospedeiro (BRAVO et al., 1987; MARTINEZ et al., 1988; AYLLON et al., 1989). Já os fatores epidemiológicos seriam alta densidade do vetor, população suscetível, infecção seqüencial, intervalo entre as infecções, o vírus infectante seguinte e circulação dos vírus em grande intensidade (GUZMÁN et al., 1986; MORIER et al., 1987). Por fim, os fatores relacionados com o próprio vírus, ou seja, a virulência da cepa infectante, o sorotipo e a variante ou genótipo dentro de cada sorotipo (CUNHA, 1997; RICO-HESSE, 1997).

#### **2.4 Transmissão e vetor**

O vírus Dengue é transmitido ao homem por meio da picada de dípteros hematófagos, principalmente do mosquito *A. aegypti*, uma espécie tropical e subtropical encontrada no mundo inteiro. Nas Américas, o *A. aegypti* é um dos vetores mais eficientes para arbovírus, por ser altamente antropofílico prosperando em proximidade com o homem e, geralmente, sobrevive em ambientes fechados e úmidos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001). Uma vez contraído o vírus, o mosquito permanece infectado durante toda a sua vida, transmitindo o mesmo aos indivíduos susceptíveis durante a sondagem e a alimentação. As fêmeas infectadas também podem passar os vírus à próxima geração de mosquitos, por meio da transmissão transovariana, mas apesar de ocorrer com baixa frequência, é de grande importância epidemiológica sugerindo que o vetor deve ter um importante papel na permanência do vírus no ambiente

(ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001; CASTRO et al., 2004). Assim os mosquitos podem atuar como reservatórios destes vírus (JOSHI et al., 2006).

O homem é o principal hospedeiro e multiplicador do vírus, encontrado na corrente sanguínea no momento em que o paciente encontra-se em estado febril. Os mosquitos não infectados podem contrair o vírus durante o repasto sanguíneo em um indivíduo que esteja em estado de viremia. O vírus então é multiplicado nas células do mosquito durante um período de 8 a 10 dias. Após esse período, o vetor está apto a transmitir o vírus ao homem, por sondagens ou alimentação subseqüentes. No homem, o período de incubação do dengue varia de 2 a 7 dias. Experimentos laboratoriais demonstraram que o mosquito *A. aegypti* pode ser infectado concomitantemente por diferentes arbovirus e que é também capaz de transmiti-los simultaneamente (ARAÚJO et al., 2006). De acordo com Wenming et al. (2005) é possível que mosquitos infectados com DEN-2 e DEN-3 podem transmitir ambos em áreas onde dois ou mais sorotipos circulam associado com a alta prevalência do vetor.

As precárias condições ambientais dos centros urbanos, a umidade e a temperatura brasileiras, associadas à resistência dos ovos do *A. aegypti* por longos períodos de dessecação, favorecem a proliferação desse mosquito e, contribuem para que a dengue seja considerada, atualmente, a arbovirose mais importante e uma prioridade de saúde pública nos países tropicais e subtropicais. (GUZMAN et al., 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001).

## 2.5 Ciclos de Transmissão

Outros mosquitos estão envolvidos no ciclo silvestre que transmitem os vírus entre primatas não humanos, os quais experimentam infecção assintomática. O ciclo silvestre tem sido observado na Ásia, associados ao gênero *Ochlerotatus* que atuam como principal vetor, na África *Aedes albopictus* e vários vetores silvestres incluindo *Aedes taylori-furcifer*, *Aedes luteocephalus* e *Aedes opok* estão envolvidos na transmissão (GLUBER, 1998; WANG et al., 2000). Nas Américas, onde o dengue é transmitido principalmente por mosquitos peridomésticos da espécie *Aedes aegypti* predominantemente urbana, o vírus nunca foi isolado a partir de espécies silvestres, nem de primatas não-humanos (DEGALLIER et al, 2001).

## 2.6 Co-infecção e Recombinação

A co-infecção natural com os vírus dengue pode ocorrer em áreas altamente endêmicas onde diferentes sorotipos têm sido transmitidos por muitos anos. Casos de infecção simultânea por mais de uma espécie de arbovírus em mosquito ou hospedeiro humano foram registradas (MEYERS & CAREY, 1967; GUBLER et al, 1985). No Brasil, em 2001 um caso de co-infecção pelos sorotipos DEN-1 e DEN-2 foi detectado através de testes de imunofluorescência e RT-PCR em um paciente com diagnóstico de dengue clássico (SANTOS et al., 2003).

Em 2005, um caso de co-infecção devido a DEN-2 e DEN-3 foi confirmado durante um surto de dengue no Estado do Ceará em um paciente com febre do dengue (ARAÚJO et al., 2006). Infecção simultânea por diferentes cepas dos vírus dengue em humanos ou mosquitos reforça o potencial para recombinação (SANTOS et al., 2003). Apesar da recombinação ser raramente registrada em

vírus RNA de fita positiva (LAI, 1992), com alguns exemplos ocorrendo nos picornavirus, coronavírus, e nos alphavirus, estes últimos são também transmitidos por mosquitos (HAHN et al., 1998), a variação nos vírus dengue e a grande mistura de populações de hospedeiros e vetores tem sugerido que a troca genética entre as cepas aumentam a possibilidade de recombinação (KUNO, 1997).

## 2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### Isolamento do Vírus

Os dois métodos básicos para o estabelecimento de um diagnóstico laboratorial da dengue são: a detecção dos vírus (por exemplo, cultura), ou a detecção de anticorpos IgM antidengue (sorologia). As amostras de sangue para o isolamento viral devem ser coletadas com intervalo igual ou inferior a cinco dias a partir do início dos sintomas, os soros são obtidos por centrifugação e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

A inoculação das amostras clínicas nos mosquitos adultos ou em larvas é a técnica de cultura mais sensível do vírus da dengue. Nos laboratórios em que mosquitos colonizados não estão disponíveis, as amostras podem ser inoculadas em qualquer uma das várias linhagens celulares disponíveis nos mosquitos, a linha celular C6/36 (clone de *Aedes albopictus*) apresenta alta sensibilidade aos vírus dengue e a outros arbovirus.

### Diagnóstico sorológico

Para o diagnóstico sorológico devem ser coletadas amostras de pacientes a partir do sexto dia de doença, após a centrifugação os soros são armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O MAC-ELISA é um ensaio de captura de anticorpos IgM do soro suspeito por sensibilização da placa com uma anti IgM humana, e após as diversas etapas do ensaio (bloqueio, diluição, lavagem, incubação overnight com o pool de antígeno (DEN-1, DEN-2 e DEN-3) a presença de anticorpos IgM específicos para dengue no soro do paciente é demonstrada pela mudança de cor do substrato ao sofrer ação enzimática do conjugado, a intensidade de cor está diretamente

proporcional a quantidade de anticorpos da classe IgM específicos contidos no soro (KUNO et al., 1987).

A Inibição da Hemaglutinação (IH) é um teste simples, sensível e reproduzível e tem a vantagem de usar reagentes que podem ser preparados no local. Os anticorpos IH aparecem na primeira semana após o início da doença, na hemaglutinação os vírus da dengue aglutinam aglomerados de eritrócitos de algumas outras espécies tão bem como o dos glóbulos vermelhos do sangue humano do tipo O tripinizado. O teste IH é baseado na capacidade de os anticorpos contra o vírus da dengue inibirem esta aglutinação (SHOPE, 1963).

#### **Reação em cadeia da Polimerase (PCR) conjugada a transcrição reversa (RT-PCR):**

A multiplicação/ replicação PCR poderá ser usada para amplificar o RNA se a transcrição reversa do RNA para o cDNA alvo for usada como etapa inicial. Se a base de oligonucleotídeos específico da dengue for empregada, as análises de transcrição reversa e multiplicação/ replicação PCR podem detectar uma pequena quantidade de moléculas de RNA da dengue entre milhões de outras moléculas de RNA. Diferentemente de amplificação biológicas mais limitadas por meio da cultura, uma multiplicação/ replicação enzimática de milhões de camadas pode ser realizada em questão de horas. Além disso, já que o ácido nucléico pode ser separado das proteínas na etapa de preparo da amostra, o RNA da dengue pode ser purificado a partir de complexos imunes. Portanto, a transcrição reversa e a multiplicação / replicação PCR apresentam pela primeira vez uma técnica que apresenta o potencial de detectar o vírus da dengue durante a convalescença, quando os anticorpos circulantes iriam limitar sua detecção (OMS, 2001).

O RT-PCR é indicado como um excelente método de diagnóstico, devido à sensibilidade, especificidade e a rápida detecção de quantidades mínimas de material genético em amostras de pacientes (Ministério da Saúde 2005). Todavia, este método deve ainda ser considerado uma abordagem experimental; a sua aplicação em larga escala espera por mais experimentos, por um consenso sobre o preparo adequado das amostras e pela determinação das seqüências das bases de oligonucleotídeos capazes de detectar todos os ou a maioria dos genótipos da dengue em circulação (OMS, 2001).

## **2.8 EPIDEMIOLOGIA**

### **Dengue no Mundo**

O dengue tem sido encontrado em grandes centros urbanos de várias regiões do mundo, inclusive no Brasil, na forma de epidemias de grande magnitude e na forma hiperendêmica, em locais onde um ou mais sorotipos já circularam (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 1999). Registros da literatura apontam que essa doença é muito antiga. Dados clínicos e epidemiológicos, compatíveis com o dengue podem ser encontrados em enciclopédia chinesa datada de 610 DC. Também, foram descritos surtos de uma doença febril aguda no oeste da Índia Francesa, em 1635, e no Panamá, em 1699, não existindo consenso de ser febre do dengue ou Chikungunya (GUBLER, 1997). Melhores registros em relação ao período anterior à identificação dos sorotipos são as Ilhas de Java (Jacarta) e as do Egito, ambas em 1779, além da Filadélfia (USA) no ano seguinte (MARTINEZ – TORRES, 1990).

No transcorrer dos três últimos séculos, tem-se registrado a ocorrência do dengue em várias partes do mundo, com pandemias e epidemias isoladas, atingindo as Américas, a África, a Ásia, a Europa e a Austrália. De acordo com Howe (1977), ocorreram no mundo oito pandemias, com duração de três a sete anos, no período entre 1779 e 1916.

O sorotipo DEN-1 predominou nas Filipinas na década de 20, durante uma intensa circulação nas regiões do Pacífico Sul e na Ásia, iniciada nos anos 30 e que perdurou por todo o período da II Guerra Mundial. Existem evidências de que no século XIX e primeiras décadas do século XX, quando os meios de transportes não eram tão rápidos, um único sorotipo persistia em determinadas regiões, causando surtos epidêmicos periódicos (GUBLER, 1997).

Após a II Guerra, que favoreceu a circulação de vários sorotipos em uma mesma área geográfica, ocorreram surtos de uma febre hemorrágica severa que posteriormente, seria identificada como dengue. Os primeiros surtos foram descritos nas Filipinas, em 1953 e, em Bancoc (Tailândia), em 1958 (MARTINEZ-TORRES, 1990). De acordo com Gubler (1997), esta forma clínica já ocorria antes do século XX, pois desde 1780, há relatos esporádicos de doença hemorrágica associada a severas epidemias de dengue. Entre 1927 e 1928 na Grécia, identificou-se uma grave epidemia de dengue hemorrágica com a circulação dos sorotipos DEN-1 e DEN-2 (HALSTEAD, 1980).

Progressivamente, outros países do Sudeste Asiático também apresentaram surtos de dengue hemorrágica: Vietnã do Sul (1960), Singapura (1962), Malásia (1963), Indonésia (1969) e Birmânia (1970). Nos anos 80, a doença expandiu-se para Índia, Sri Lanka, Maldivas e leste da China. Atualmente, sob a forma de epidemia ou endemia, milhares de casos e de óbitos vêm ocorrendo a cada ano,

predominantemente em crianças, e a circulação dos vírus DEN-1 e DEN-2 persiste até o presente (GUBLER, 1997).

O vírus DEN-3 tem sido associado com o dengue hemorrágico na Índia, Sri Lanka e América Central, durante um surto em Saint Martin (French West Indies) em 2003-2004, a análise do genoma indicou uma origem comum para o DEN-3 circulando no Caribe e América Latina; o ancestral deles provavelmente originado do Sri Lanka. Os vírus pertencentes ao subtipo III incluíram vírus do Sri Lanka/Índia/África e Samoa, foram primeiro registrados na Nicarágua e Panamá em 1994, na Guatemala de 1996 a 1998; em Porto Rico, Barbados, e Jamaica em 1998; e na Martinica em 1999 (LANCIOTTI et al., 1994; DIVISION OF VECTOR-BORNE INFECTIOUS DISEASES, 1995).

O número de casos de DHF e DSS tem aumentado nas últimas duas décadas na Índia e DEN-2 tem sido considerado o agente causador destes surtos. Contudo em epidemia de regiões da Índia incluindo a capital Delhi e Gwalior em Madhya Pradesh em 2003 e novos casos de dengue registrados durante 2004 em Delhi o vírus DEN-3 foi implicado como o sorotipo responsável. O estudo de seqüência nucleotídica dos isolados revelou a presença do subtipo III de DEN-3, indicando este como o causador da epidemia de 2003 e 2004, o ressurgimento dominante do sorotipo DEN-3 (subtipo III) em substituição ao de DEN-2 pode ser atribuído como o fator de incidência de DHF e DSS na Índia (DASH et al., 2006). A emergência de um novo genótipo após um intervalo permite um maior surto, e representa um grande problema de saúde pública que deve ser considerado, os estudos moleculares epidemiológicos demonstram que há uma associação direta entre a introdução de um genótipo e a severidade da doença, podem portanto indicar as cepas com patogenicidade aumentada (RICO-HESSE et al, 1997).

A análise de seqüências revelou que o subtipo III de DEN-3 esta circulando em todo mundo, enquanto outros subtipos estão localizados em particular em pequenas áreas geográficas. Isto indica o alto potencial do subtipo III para se expandir, adaptar e dominar diversas áreas geográficas do mundo. Este genótipo também tem sido implicado em epidemias de DF/ DHF de várias partes da Ásia, África e Américas, e tem um potencial para causar uma pandemia trans-nacional (MONATH, 1994).

A rápida expansão de DEN-3 pertencentes ao subtipo III, o qual tem substituído DEN-1 e 2, indica que este vírus tem se adaptado às condições do Caribe e América Latina, as cepas foram isoladas durante epidemias de DF e DHF, e elevado número de casos de DHF devido a infecções de DEN-3 podem ser esperadas em países onde a possibilidade de um elevado número de infecções secundárias existe (GUZMÁN et al., 1996).

### **Dengue nas Américas**

Nas Américas o vírus dengue circula desde o século XIX até as primeiras décadas do século XX, seguido por um período de silêncio epidemiológico, e a reintrodução dos sorotipos 2 e 3 nos anos 70. Os primeiros casos relacionados ao dengue 3 foram identificados na Jamaica, Martinica, Curaçau, Antigua, Saint Kitts, Sanguilla, Porto Rico, Venezuela e Colômbia além de casos importados nos Estados Unidos (DONALISIO,1995). Entre 1968 e 1970, epidemias com os vírus 2 e 3 foram registradas no Caribe, na Guiana Francesa e na Venezuela. Na década de 70 ocorreram epidemias na Colômbia, em Porto Rico e em Saint Thomas, com isolamento dos mesmos vírus. No início da década de 80, foi isolado o DEN-4, destacando-se este período pela intensa circulação dos vírus no continente

americano e os países que mais notificaram casos foram: Brasil, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Porto Rico e Venezuela (PINHEIRO, 1996).

A epidemia mais importante na história do dengue ocorreu em Cuba em 1981, onde se detectou a dengue hemorrágica e a síndrome de choque do dengue, quando 344.203 casos foram notificados, resultando em 158 óbitos. O dengue 2 foi associado a esta epidemia, que foi precedida por outra em 1977, causada pelo dengue 1 (KOURI, 1986).

Nos anos 90, epidemias de dengue clássico foram freqüentemente observadas em vários centros urbanos, muitas delas associadas à ocorrência de casos de dengue hemorrágica (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1999).

A maior incidência na região foi observada em 2002, com mais de um milhão de casos, entre eles 14.000 de DHF. Segundo dados da OPAS, em novembro de 2005, 27 países haviam notificado casos de DF e DHF e em 14 deles circulavam dois ou três sorotipos simultaneamente. Na atualidade, sabe-se que há presença de um ou mais sorotipos do vírus dengue circulando na maioria dos países do continente americano, com ocorrência sistemática de casos de dengue clássico e hemorrágico (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2005).

### **Dengue no Brasil**

No Brasil, dados da literatura relatam evidências de epidemias de dengue desde 1946, em São Paulo e Rio de Janeiro (MEIRA, 1946). No entanto, as primeiras referências na literatura médica datam de 1916, em São Paulo e 1923, em Niterói (PEDRO, 1923). Os primeiros registros documentados clínica e

laboratorialmente ocorreram em 1981 e 1982, em Boa Vista (RR) causado pelos sorotipos 1 e 4 (OSANAI, 1984) e, em 1986, foram registradas epidemias nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Alagoas e Ceará (VASCONCELOS et al., 1998). Em 1990, ocorreu um recrudescimento em grandes proporções, em consequência do aumento da circulação do DEN-1 e a introdução do DEN-2 no Rio de Janeiro, surgindo neste período os primeiros casos de dengue hemorrágica. A partir de 1995, vários estados registraram casos de febre hemorrágica, sendo a letalidade média para o país no período de 1990-1998 de aproximadamente 5% (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

A circulação viral desses sorotipos nos anos subseqüentes gerou epidemias que foram se expandindo para todas as regiões, com exceção de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde se registraram apenas casos importados. Na região Norte, além do Estado de Roraima, registraram-se surtos nos Estados do Acre, Amapá, Pará, Rondônia, Tocantins e Amazonas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Em 2001 foi detectado pela primeira vez no Brasil, no município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro o sorotipo DEN-3. Em Nova Iguaçu havia sido detectada epidemia subseqüente de DF, quando DEN-1 e DEN-2 foram isolados durante o verão de 2000-2001 (NOGUEIRA et al., 2001). A epidemia de DEN-3, ao contrário dos outros sorotipos, expandiu-se rapidamente. Após dois anos de seu isolamento o DEN-3 foi detectado em 22 estados brasileiros e em mais de 2.900 municípios. Todas as 22 cepas brasileiras analisadas em 2001 foram classificadas como genótipo III, que representa cepas do Sri Lanka (1981-1985) e recentes isolados da América Central, Nicarágua (1995-1998), Guatemala (1997) e El Salvador (1998), este genótipo tem sido associado com epidemias de DHF no Sri

Lanka e Índia e com DHF e óbitos no México e América Central (MIAGOSTOVICH et al, 2002).

Com a introdução do DEN-3 foram observadas mudanças na expressão clínica da doença e o aumento da incidência de dengue hemorrágica. A ausência de um diagnóstico inicial e tratamento adequado favoreceram a alta razão de casos fatais, maior do que 5,5%, enquanto em alguns países do continente asiático tais como Tailândia, a razão de casos fatais é menor do que 1% (TEIXEIRA et al., 2005).

Atualmente, há circulação autóctone dos sorotipos 1, 2 e 3 em praticamente todo o Brasil. Em 2004 um total de 105.894 casos de dengue foram notificados, com a confirmação de 60 casos de febre hemorrágica e dois óbitos registrados nos Estados de Minas Gerais e Alagoas. A taxa de letalidade por febre hemorrágica foi de 3,3% (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005). Em 2005 foram registrados 248.189 casos de dengue e em 2006 um total de 280.511 casos de dengue foram notificados, com a confirmação de 530 casos de DHF e 61 óbitos distribuídos nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2006). No período de janeiro a novembro de 2007 foram registrados 536.519 casos suspeitos de dengue, 1.275 casos confirmados de Febre Hemorrágica da Dengue (DHF) e a ocorrência de 136 óbitos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2007). Neste mesmo período a Secretaria de Vigilância em Saúde registrou um total de 12.608 inoculações para isolamento viral. Em quatro Estados detectou-se a circulação simultânea dos sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3; em seis estados a circulação simultânea dos sorotipos DEN-2 e DEN-3; em oito estados a circulação exclusiva do sorotipo

DEN3 e em um estado a circulação do sorotipo DEN-2, estes dados podem não refletir as possíveis variações da circulação viral em cada um dos municípios.

No Brasil, os registros de dengue estão subestimados por se tratar de uma doença cujos sintomas são facilmente confundidos com os de outras doenças febris exantemáticas. Por esse motivo, grande parte dos pacientes não procura assistência médica, levando a um subregistro da doença. Esta situação somada a crescente dispersão do *A. aegypti* em todo território nacional e a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 levam a condições imunológicas e epidemiológicas necessárias para o desenvolvimento das formas graves da doença, sob o risco de novas infecções pelo sorotipo 4, que já circula na Venezuela, México, Porto Rico e Colômbia (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005).

### **Dengue em Manaus**

No início de 1998, o Laboratório de Arbovirologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), em Manaus, iniciou um programa de vigilância e diagnóstico para doenças virais transmitidas por artrópodes (arboviroses), a fim de determinar os seus agentes etiológicos, sendo diagnosticada precocemente a primeira epidemia de dengue na cidade de Manaus. O diagnóstico foi realizado por estudos sorológicos utilizando o teste MAC-ELISA para detecção de anticorpos IgM. Foram analisadas 8.557 amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de dengue, sendo que 40% dos soros foram ELISA positivos para o vírus dengue, o sorotipo DEN-1 foi considerado o responsável por esta epidemia (FIGUEIREDO et al., 2004). O Município de Manaus foi o mais atingido, no entanto, outros municípios, tais como Autazes, Careiro, Coari, Iranduba,

Manacapuru e Tefé apresentaram casos positivos, por sorologia. Em 2001, casos de febre hemorrágica do dengue foram registrados no Estado do Amazonas, com o isolamento viral, pela primeira vez, do DEN-2 (FIGUEIREDO *et al.*, 2002), a co-circulação de dois sorotipos mostrou que sucessivas infecções são responsáveis pelo aparecimento das formas clínicas mais severas da doença (BASTOS, 2004). Casos de dengue clássico e hemorrágico foram notificados a cada ano (Figura 1; Figura 2). Em 2002 foi isolado pela primeira vez o sorotipo DEN-3 de um paciente procedente da Bahia, a partir daí outros casos de DEN-3 foram diagnosticados por isolamento viral (FIGUEIREDO *et al.*, 2003).

A localização geográfica da região amazônica, juntamente com a dinâmica da epidemia de dengue, fazem com que a expectativa de que casos mais severos possam ocorrer. Isso se deve à circulação dos vírus DEN-1, DEN-2 e DEN-3 na capital amazonense, rápida expansão e disseminação do vetor associado aos modernos meios de transporte.

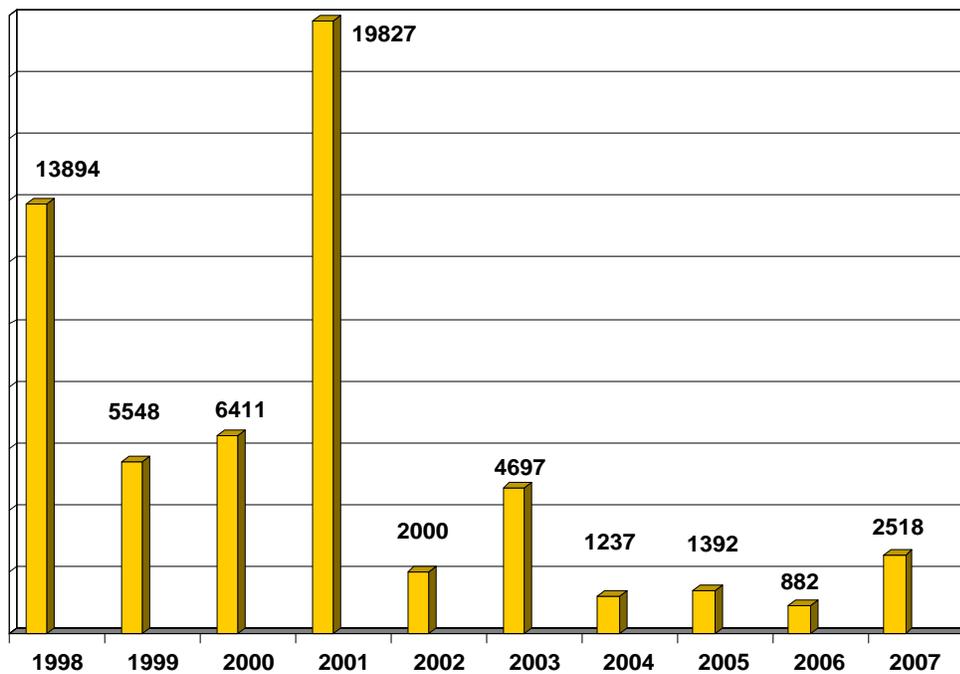


Figura 1. Casos de dengue clássico notificado no Amazonas no período de janeiro de 1998 a novembro de 2007.

Fonte: SVS

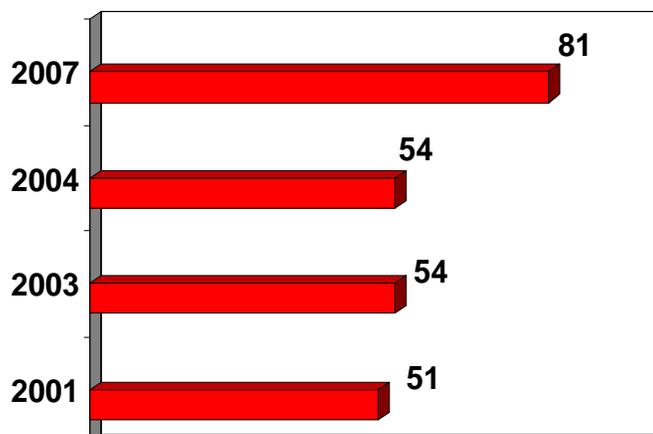


Figura 2. Casos de dengue hemorrágico notificado no Amazonas.

Fonte: SVS

## 2.9 ESTUDOS MOLECULARES DOS VÍRUS DENGUE

### ESTRUTURA GENÉTICA

Os membros da família *Flaviviridae* são vírus RNA, que apresentam algumas características físico - químicas semelhantes as do *Alphavirus*. Entretanto, o diâmetro dos vírions é menor, oscilando de 20 a 50 nm, apresentando patogenicidade para camundongos e capacidade de aglutinar hemácias de ganso e de pinto. Alguns membros são capazes de formar placas em culturas de ovos embrionados de patos e de galinhas, sem produzir, no entanto, efeito citopático quando essas culturas são mantidas em meio líquido. Vários

membros do grupo determinam o aparecimento de efeito citopático e de placas nas linhagens celulares Vero, BHK 21 entre outras (PINHEIRO *et al.*, 1983).

O genoma dos flavivírus tem cerca de 11 kb (kilobases) contem uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína. A seqüência completa foi identificada para cada um dos protótipos do dengue. O genoma é composto de três genes que codificam para proteínas estruturais e sete genes para proteínas não estruturais (Figura 3). As proteínas estruturais são a proteína C que forma o nucleocapsídeo, a glicoproteína prM precursora da proteína M que junto com a proteína E formam o envelope do vírus, e induz a formação de anticorpos neutralizantes. O genoma ainda codifica as proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. A proteína E está envolvida na interação com os receptores celulares e na fusão do envelope com a membrana celular (CHAMBERS *et al.*, 1990; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001; SANTOS *et al.*, 2002).

Em outros flavivírus, incluindo febre amarela e encefalite japonesa, os principais marcadores moleculares para a patogenicidade foram localizados no gene E. Em relação ao dengue, estudos realizados descrevem diferentes regiões gênicas com alta frequência de mutações, possivelmente associados à virulência. Muitos destes estudos sugerem que os genes para as proteínas prM, E, NS1, e NS3 sejam importantes para a infecciosidade viral, sendo portanto alvos para a variabilidade genética (LEITMEYER *et al.*, 1999).

Os vírus da dengue apresentam muitas características em comum com outros flavivírus. O genoma é constituído por uma fita única de RNA, envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico e recoberto por um envelope lipídico, onde estão inseridas pequenas proteínas de membrana e espículas de natureza glicoprotéica.

A partícula viral completa apresenta uma densidade de 1,19 a 1,23 g/ml, sendo inativada por solventes lipídicos, como éter, clorofórmio e desoxicolato, uréia, betapropiolactona, aldeídos, lipases e proteases. A radiação ultravioleta e o aquecimento a 56 °C, durante 30 minutos também inativam o vírus (SANTOS, N. *et al.*, 2002).

Estudos sobre a estrutura genética dos vírus dengue e seu processo evolucionário têm revelado que cada sorotipo apresenta grupos de vírus denominados como genótipos ou subtipos (HOLMES & TWIDDY, 2003). Cepas de humanos e de primatas não humanos freqüentemente são classificadas em genótipos diferentes, indicando que o ciclo humano e silvestre ocorrem independentemente. Alguns genótipos são cosmopolitas enquanto outros estão restritos a determinadas áreas geográficas, a diversidade viral é maior no Sudeste Asiático sugerindo esta região como a fonte das epidemias de dengue (ZHANG *et al.*, 2005).

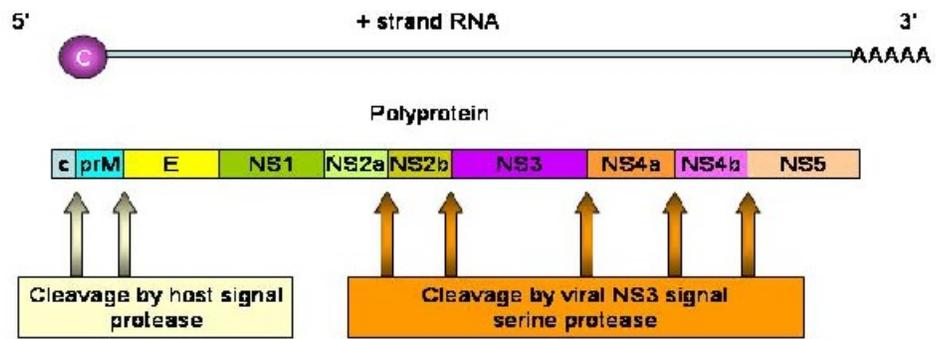


Figura 3. Genoma do vírus dengue

## **BIOSSÍNTESE VIRAL**

Ainda não se conhece a estrutura presente na superfície celular que serve como receptor para o vírus dengue. Segundo alguns estudos o vírus dengue pode entrar em células humanas alvo (monócitos, macrófagos, linfócitos B, medula óssea) através de muitos receptores, entre eles alguns específicos para este vírus. Acredita-se que existam receptores celulares de primeira, segunda e terceira ordem, muitos deles não estão definidos completamente, que devem ligar-se aos receptores virais localizados em determinados domínios da proteína E relacionados com a penetração do vírus na célula e sua fusão com a membrana celular (HALSTEAD et al, 2005).

Após a liberação do RNA genômico no citoplasma celular, este é traduzido em uma poliproteína que, posteriormente, é clivada gerando proteínas não estruturais e proteínas que farão parte da partícula viral. A replicação do RNA genômico ocorre também no citoplasma e inicia-se com a síntese de uma fita de RNA complementar, com polaridade negativa, que serve como molde para a produção de novas fitas de RNA com polaridade positiva. A montagem da partícula viral ocorre nas proximidades do retículo endoplasmático, onde adquire o envelope. O transporte para a membrana plasmática é realizado por meio de vesículas que se fundem com a membrana celular, liberando partículas por exocitose. O brotamento através da membrana citoplasmática é observado ocasionalmente, indicando não ser esse o principal mecanismo de liberação da partícula viral da célula hospedeira (SANTOS, N. et al., 2002).

## **DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DENGUE**

Vários são os fatores que limitam a prevenção e o controle das epidemias do dengue. Estes incluem a falta de uma vacina tetravalente para aplicação em larga escala, bem como dificuldades de controle do mosquito vetor. Neste contexto, os estudos de variabilidade genética e de epidemiologia molecular têm se tornado ferramentas indispensáveis para identificar variantes genéticas mais virulentas, as quais potencialmente podem causar formas mais severas da doença (NOGUEIRA et al., 2000).

A epidemiologia molecular do vírus dengue também tem sido usada para determinar a origem dos vírus que tem causado surtos e epidemias, especialmente na tentativa para estabelecer uma correlação entre o grau de virulência das amostras e o impacto destas viroses na população. A variação intratípica nos vírus dengue foi primeiramente demonstrada, por meio de técnicas sorológicas, que demonstraram diferenças antigênicas e biológicas entre amostras do mesmo sorotipo (MCCLOUD et al., 1971; RUSSEL & MCCOWN, 1972). Outras metodologias confirmaram a existência de variabilidade antigênica e variabilidade genética entre os vírus dengue. Análises de seqüenciamento dos genomas virais permitiram maior discriminação dentro e entre os sorotipos, e tem definido novas variantes genotípicas (Quadro 1). O seqüenciamento de 240 pb que compreende uma região de junção entre os genes E e NS1, caracterizou cinco grupos genômicos para DEN-1 e cinco grupos para DEN-2 (RICO-HESSE,1990). Posteriormente, o seqüenciamento completo do gene que codifica a proteína E foi realizado no sorotipo DEN-2 (LEWIS et al., 1993), estabelecendo cinco subtipos, que correspondem àqueles sugeridos por Rico-Hesse (1990).

O seqüenciamento parcial de diferentes amostras dos sorotipos DEN-3 e DEN-4 demonstraram a existência de quatro e dois subtipos genéticos, respectivamente (LANCIOTTI *et al.*, 1994). A seqüência completa do gene E de diversas cepas permitiu duas alterações na classificação dos genótipos. Como resultado deste estudo foi sugerido quatro genótipos para DEN-2 e três para DEN-4 (Quadro 2) (RICO- HESSE, 2003).

A análise dos sorotipos DEN-1 e DEN-2, isolados no Estado do Rio de Janeiro, demonstraram que estes vírus pertencem aos genótipos I e III, respectivamente (VORNDAM *et al.*, 1994). Em estudos posteriores, foi seqüenciado o gene que codifica a proteína E (região entre a posição 1685 e 2504) de amostras de DEN-2 isoladas no Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Alagoas, para investigar os genótipos circulantes no Brasil entre 1990 e 1995. Essas análises confirmaram a origem do DEN-2 circulante no Brasil identificando a presença do genótipo III, demonstrando a dispersão deste vírus do Rio de Janeiro para outros Estados. Algumas amostras isoladas no Rio de Janeiro, em 1995, apresentaram um número elevado de mutações, refletindo a evolução do vírus DEN-2, desde sua introdução neste Estado (MIAGOSTOVICH *et al.*, 1998).

O genótipo III de origem Asiática foi isolado nas Américas durante um surto no Caribe, em 1981. Esse fato confirma que as amostras de DEN-1 e DEN-2 circulantes no Brasil são originárias do Caribe, chegando ao país através de pessoas ou vetores infectados (RICO-HESSE,1990). Esse genótipo representa elevado potencial para desenvolver dengue hemorrágico, especialmente em áreas onde o DEN-1 e DEN-4 circularam anteriormente (VORNDAM *et al.*, 1994). A introdução desses genótipos nas Américas resultou em um significativo aumento da dengue hemorrágica e da síndrome de choque por dengue (Venezuela, 1989;

Brasil, 1990-91). Até 1980, os casos de DHF/DSS nas Américas eram esporádicos e associados com o genótipo de Porto Rico (GUBLER, 1992).

Outro estudo de seqüenciamento realizado por Rico-Hesse *et al.* (1997) indicou a existência desse genótipo (Jamaica) do vírus DEN-2 nas Américas, e relaciona o elevado grau de virulência quando envolvido na infecção secundária. Na Venezuela, a circulação destas variantes em 1994, 1995 e 1996 resultou em um grande número de casos de DHF/DSS, sendo alguns destes fatais.

Vírus	Genótipo	Distribuição Geográfica
DEN-1	I	Américas, África, Sudeste da Ásia
	II	Sri Lanka
	III	Japão
	IV	Sudeste Asiático, Pacífico Sul, Austrália, México
	V	Taiwan, Tailândia
DEN-2	I	Caribe, Pacífico Sul
	II	Taiwan, Filipinas, Nova Guiné
	III	Vietnã, Jamaica e Tailândia
	IV	Indonésia, Seichelles, Burkina Faso, Sri Lanka
	V	África Rural
DEN-3	I	Filipinas, Indonésia, Malásia, Pacífico Sul
	II	Tailândia
	III	Sri Lanka, Índia, África
	IV	Pacífico Sul, Américas
DEN-4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka
	II	Indonésia, Pacífico Sul, Américas

Quadro 1-Variantes genotípicas de vírus dengue determinadas através de seqüenciamento parcial do genoma viral (MONATH & HEINZ, 1996 apud DOS SANTOS, 2000).

Vírus	Genótipo	Distribuição Geográfica
DEN-1	I,II,III,IV,V	Malásia, Américas, África, Sul do Pacífico, Ásia e Tailândia.
DEN-2	I,II,III,IV	África Ocidental, Américas, Sudeste Asiático e Malásia/ subcontinente indiano.
DEN-3	I, II, III, IV	Américas, subcontinente indiano, Tailândia e Sudeste Asiático/ Sul do Pacífico
DEN-4	I, II, III	Malásia, Sudeste Asiático e Indonésia.

Quadro 2-Variantes genotípicas de vírus dengue determinadas através da seqüência completa do gene E (RICO-HESSE, 2003 apud NOGUEIRA & CUNHA, 2005).

A análise filogenética das cepas de DEN-2 inicialmente identificou cinco genótipos, incluindo dois de origem do Sudeste Asiático (Asiático (II) e Americano – Asiático (III) ) (RICO-HESSE, 1990; LEWIS *et al.*,1993). Outros estudos incorporando outras cepas resultaram na fusão destes dois subgrupos dentro do **genótipo III** Asiático/Americano - Asiático (RICO-HESSE *et al.*, 1998). Análises detalhadas de 240 pb (região de fusão gênica E/NS1) mostraram que a variante III DEN-2 Asiático/Americano - Asiático foi introduzida nas Américas e foi distribuída por duas décadas, substituindo o genótipo I nativo Americano (RICO-HESSE *et al.*, 1997). O genótipo III Asiático/Americano tem sido associado com casos de DHF, enquanto o genótipo I Americano foi associado somente com dengue clássico. Recentemente, Leitmeyer *et al.* (1999) seqüenciaram o genoma completo do DEN-2 isolado diretamente de um soro virêmico e identificou diferenças de nucleotídeo que consistentemente diferenciou os vírus DEN-2/III Asiático/ Americano – Asiático do genótipo nativo I Americano DEN-2.

A análise completa de uma seqüência do genoma de uma cepa Brasileira (BR64022/98) permitiu a determinação das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, constituindo a primeira caracterização genética completa de uma cepa de DEN-2 do Brasil. Todas as mudanças nos aminoácidos relacionadas ao genótipo III Asiático/Americano - Asiático foram observadas em *BR64022/98*, indicando a origem asiática da cepa (SANTOS et al., 2002).

A comparação de grupos genéticos virais com associações clínicas e epidemiológicas permite identificar diferenças estruturais que podem corresponder ao potencial patogênico. Diferenças de aminoácidos entre os genótipos do Sudeste Asiático e Americano na posição 390 da proteína E é de maior importância. A glicoproteína E que está na superfície do vírus representa o antígeno dominante, influenciando na resposta imune do hospedeiro, mutações nos seus sítios afetam a fusão dos vírus a membrana celular e a neurovirulência (SANCHEZ & RUIZ, 1996). Sanchez & Ruiz (1996) registraram que clones de DEN-2 (cepa mexicana) com uma única mudança de aminoácidos na posição E-390 de Asp para His foram virulentas quando inoculadas intracerebralmente em camundongos lactantes.

O vírus DEN-3 circulando atualmente no continente americano pertence ao genótipo III também isolado na Índia e Sri Lanka, e que tem causado epidemias com casos graves em vários países da América Central. Recentemente este mesmo genótipo foi responsável pela mais grave epidemia de dengue ocorrida no Estado do Rio Janeiro no ano de 2002 (NOGUEIRA et al., 2002).

A caracterização genética de amostras isoladas durante esta epidemia demonstrou a similaridade existente entre as cepas brasileiras e outras representadas pelo mesmo genótipo com uma variação de 96 a 98% e de 98 a 99%

para seqüência de ácido nucléico e de aminoácidos, respectivamente. Quando comparado com cepas da Guatemala observou-se um total de 14 mudanças no ácido nucléico, resultando em mudanças no aminoácido de histidina para arginina. A alta similaridade entre as cepas do genótipo III de DEN-3 e particularmente cepas americanas indicam a provável origem dos vírus circulantes neste Estado (MIAGOSTOVICH et al, 2002).

Dos genótipos descritos para DEN-4, apenas um circula nas Américas e está representado por amostras isoladas em países da América Central, Taiti e Indonésia (RICO – HESSE, 2003). Esta cepa identificada como genótipo II também de origem asiática (LANCIOTTI, 1997), rapidamente foi distribuída por toda a região causando dengue clássico, porém somente casos esporádicos de DHF/DSS (GUBLER, 1998). No Brasil apenas o sorotipo DEN-4 foi identificado através do isolamento viral.

Recentemente a presença de várias populações virais (quasiespecies) foi demonstrada em um mesmo hospedeiro (WANG et al., 2002), além da recombinação entre as cepas, possivelmente devido à circulação simultânea de diferentes genótipos de um sorotipo em um mesmo hospedeiro (HOLMES & TWIDDY, 2003). A diversidade genética do vírus dengue pode causar o aparecimento de cepas com maior capacidade de replicação, de mais fácil transmissão ou mais virulentas. Esta diversidade genética também pode associar-se com o aparecimento de cepas com determinantes antigênicos ou tropismo alterados (CHEVILLON & FAILLOUX, 2003).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Cumprindo os requisitos da Resolução CNS/196/96, o presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas FMTAM, processo número: 272/2005 com o título Variabilidade genética do vírus dengue, DEN-1 e DEN-2, no Estado do Amazonas, Brasil (Anexo I). Após enviar ao Comitê de Ética, pela necessidade de identificação dos vírus dengue por técnicas moleculares e sua caracterização epidemiológica achou-se por bem alterar o título para “Caracterização Molecular e Epidemiológica dos vírus dengue no Estado do Amazonas, Brasil”

#### 3.1 Coleta de Material e Critérios de Inclusão

Durante o período de fevereiro de 2005 a junho de 2007 foram coletadas 534 amostras de sangue total (10 mL) pelo método vacuntainer de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM). Foram convidados a participar deste estudo pacientes com suspeita clínica de dengue e com diagnóstico negativo para malária, o fluxograma das amostras é mostrado abaixo. Os mesmos receberam informação e assinaram um termo de consentimento (Anexo II) aprovado pelo comitê de ética da FMTAM. Um questionário com informações epidemiológicas foi também preenchido (Anexo III). Os soros foram obtidos por centrifugação a 1500 rpm, na temperatura de 5°C, durante 15 minutos e armazenados em *freezer* à -70°C.

### 3.2 Diagnóstico Sorológico

Após cinco dias de sintomas esses pacientes retornaram a FMTAM para a segunda coleta de sangue. O soro foi obtido como descrito acima e armazenado a -20°C. O diagnóstico sorológico foi realizado pelo método MAC-ELISA (*Enzyme-linked – immunoabsorvent assay*), para a pesquisa de anticorpos IgM específicos para o vírus dengue, de acordo com a técnica descrita por Kuno et al. (1987) (Anexo IV). Após as diversas etapas do ensaio (bloqueio, diluição e lavagem), a presença de anticorpos no soro do paciente foi demonstrada pela mudança de cor do substrato, ao sofrer ação enzimática de um conjugado específico (HRP conjugated 6B6C-1 monoclonal antibody/Jackson), em seguida sua determinação foi feita medindo-se a densidade óptica da solução, espectrofotometricamente. A partir dos resultados obtidos nesta etapa, com os soros que estavam armazenados em *freezer* -70°C, foram executados os seguintes passos:

### 3.3 Diagnóstico Viroológico

A técnica utilizada para isolamento do vírus Dengue foi a cultura celular utilizando linhagens celulares contínuas, de células de mosquito C6/36 (clone de *Aedes albopictus*) (IGARASHI, 1978), cultivadas em garrafas de 25 cm com meio de crescimento L-15 acrescido de 5% de soro bovino fetal. E 1,5 mL desse meio foi transferido para tubos falcon (15 mL) descartáveis (1,5 mL/tubo), uma ou duas vezes por semana, dependendo da quantidade de amostras a serem testadas. As amostras de soro de pacientes, em fase aguda, obtidas dentro dos cinco primeiros dias, desde o início da febre, foram inoculadas em um volume de 70µL na diluição 1:10 nos tubos contendo monocamadas de células e incubados para

adsorção e penetração do vírus à 28°C. Cada tubo foi examinado diariamente, até completar 10 dias.

Após 10 dias de incubação as culturas foram identificadas através da técnica de imunofluorescência (IF) que permite a identificação dos sorotipos do dengue. Os fluídos dos tubos previamente inoculados foram colhidos nos pontos (spots) da lâmina (10 µL), após a secagem em temperatura ambiente, estas lâminas foram fixadas em acetona gelada por 20 minutos, e então estocadas a – 70°C quando a imunofluorescência não foi realizada imediatamente.

Em cada ponto foi adicionado 10µL do anticorpo monoclonal para cada um dos sorotipos de dengue na diluição de 1:15 correspondente a cada lâmina, incubadas durante 30 min a 37°C em câmara úmida. Após esta incubação as lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,4), deixadas nesta solução durante 5 min, lavadas em água destilada e mantidas a temperatura ambiente até estarem completamente secas.

O anticorpo secundário conjugado a fluoresceína na diluição 1:100 foi adicionado e repetiram-se os procedimentos de incubação e lavagem. Em cada ponto foi colocado 10 µL de glicerol, as lâminas foram cobertas com lamínulas para leitura em microscópio para fluorescência, para se determinar se as amostras eram positivas ou negativas levando-se em conta o observado nos controles incluídos em cada experimento. A IF específica para os vírus dengue, descreve-se como citoplasmática perinuclear (INSTITUTO PEDRO KOURI, 2001).

Os anticorpos monoclonais altamente específicos contra cada um dos quatro sorotipos do vírus dengue foram cedidos pelo “Center of Disease Control and Prevention” (CDC), Atlanta, Geórgia USA. O anticorpo secundário conjugado a fluoresceína foi obtido comercialmente.

### 3.4 Extração do RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA), seguindo-se as instruções do fabricante (Anexo V).

### 3.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) conjugada a transcrição reversa (RT-PCR):

A transcrição reversa (RT) e amplificação do DNA foram realizadas utilizando o kit *Ready-to-Go™ RT-PCR Beads* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Cada reação continha 10 µL de RNA viral, 5µL do rando primer pd(N)<sub>6</sub> para a RT e 5µL de cada um dos iniciadores D1 e D2 (Lanciotti et al., 1992) para a reação de PCR, e água (RNase free) qsp 50 µL, os quais foram submetidos a uma etapa de 42° C/ 30 min, 95° C/ 5 min. Em seguida, após incubação a 94°C/ 2 min cada cDNA foi submetido a 39 ciclos de desnaturação (94°C/ 1 min), hibridização (55°C/1 min), extensão (72°C/ 2 min) e extensão final (72°C/ 10 min). A amplificação foi conduzida em um termociclador modelo eppendorf *Mastercycler gradient*.

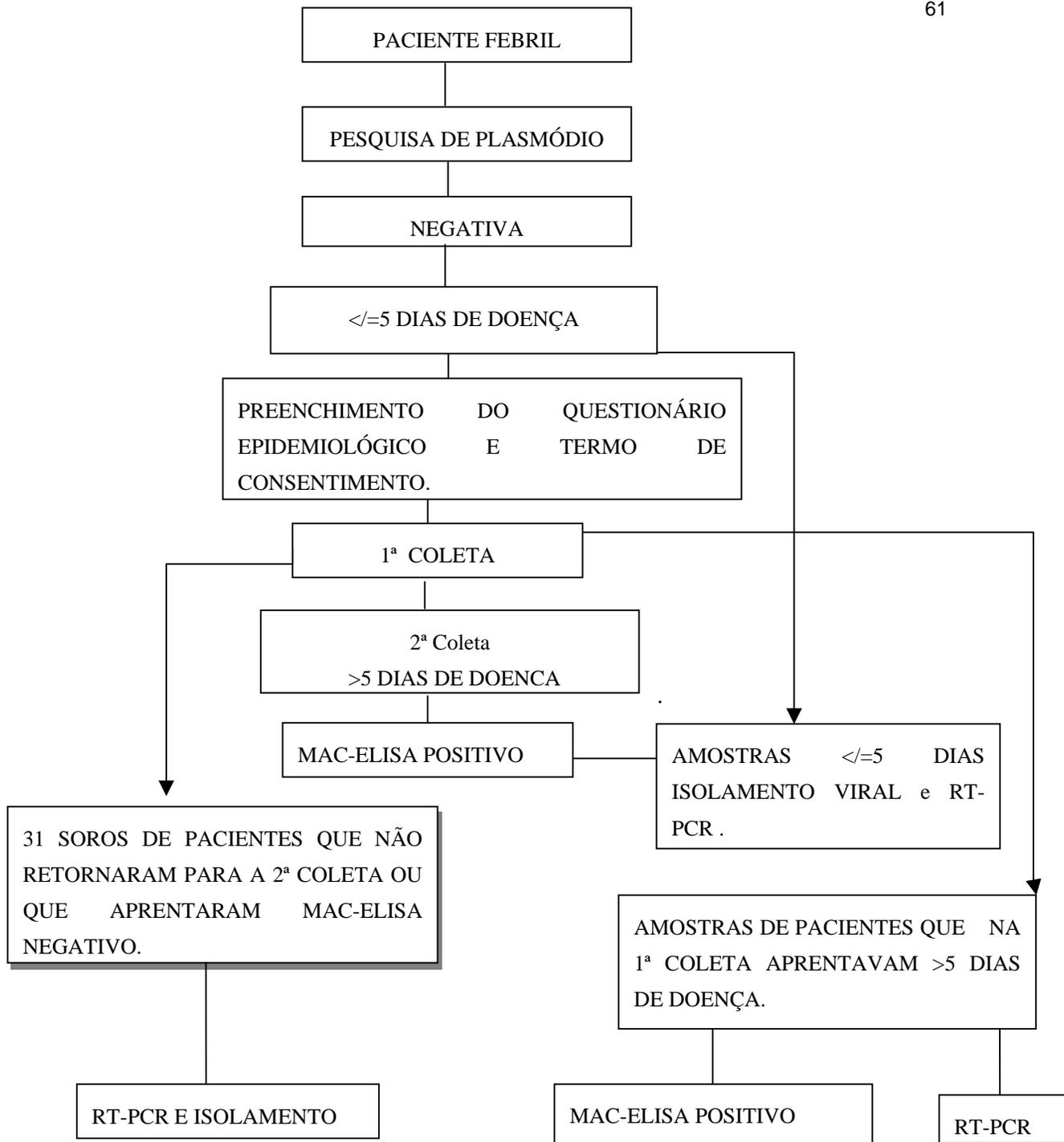
Em seguida, cada amplicon foi submetido ao procedimento de Nested PCR, desenvolvido por Lanciotti et al. (1992), para detecção e tipagem do vírus dengue. Em tubos de 0,2 mL foram adicionadas a mistura descrita abaixo (Tabela 1) e 1 µL do amplicon diluído 1:100. Após incubação a 94°C/ 2 min, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de desnaturação (94°C/ 30 seg), hibridização (55°C/ 30seg), extensão (68°C/ 30seg) e extensão final (68°C/ 1 min). O produto da

reação de PCR foi, submetido a eletroforese a 100 volts durante 30 minutos em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE 1X.

<b>Reagentes estoque</b>	<b>MIX (concentração por tubo/ reação)</b>
Água	37,0 µL
Tampão da enzima 10x	5 µL
dNTP mix 10 mM	1 µL
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1,5 µL
Iniciador D1 (10µM)	1,0 µL
Iniciador TS1 -4 (10µM)	1,0 µL
Taq Polimerase (5U/µL)	0,5 µL
Volume final	50µL

Tabela 1- Reagentes utilizados na reação de Nested – PCR.

Em amostras cujo resultado foi positivo para mais de um sorotipo, repetimos o Nested PCR com cada um dos iniciadores específicos de dengue em diferentes reações: D1+ TS1; D1+TS2; D1+TS3; D1+ DEN4. E aquelas em que foi detectado apenas um sorotipo, mas no seqüenciamento foram obtidas seqüências para mais de um vírus, o produto da PCR foi submetido a clonagem destes fragmentos.



Fluxograma das amostras testadas.

### 3.6 Iniciadores

Baseados na região que compreende parte dos genes C-prM foram desenhados por LANCIOTTI et al. (1992) os iniciadores usados na identificação dos vírus dengue com boa sensibilidade e especificidade. Este fragmento apresenta uma região conservada entre todos os vírus dengue, que permite sua amplificação usando iniciadores senso e anti-senso universais do dengue. O sorotipo é então identificado usando iniciadores sorotipo específico. As seqüências dos iniciadores e sua posição no genoma são descritas na Tabela 2, os pares de iniciadores usados na 1º PCR, na reação de Nested PCR e o tamanho do produto amplificado são mostrados na Tabela 3.

<b>Iniciadore s</b>	<b>Seqüência (5' – 3')</b>	<b>Posição no genoma</b>
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC	616-644
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421
DEN4	TGTTGTCTTAAACAAGAGAGGTC	506-527

Tabela 2- Iniciadores usados para amplificação dos vírus dengue.

<b>Iniciadores</b>	<b>Tamanho do produto amplificado (pb)</b>
D1 + D2 (1° PCR)	511
D1+ TS1 (2° PCR)	482
D1+ TS2 (2° PCR)	119
D1+ TS3 (2° PCR)	290
D1+ DEN4 (2° PCR)	392

Tabela 3- Pares de iniciadores usados no 1° PCR e na reação de nested PCR.

### 3.7 Seqüenciamento

A região que compreende parte dos genes C-prM foi a utilizada nas reações de seqüenciamento, pelo método de dideoxynucleotídeos (SANGER, 1977). Os fragmentos amplificados foram purificados com *CONCERT Rapid PCR Purification System Life Technologies*. No seqüenciamento, todos os procedimentos foram executados usando o kit de seqüenciamento de DNA Big Dye terminator (Applied Biosystems), seguindo-se as instruções do fabricante e analisadas no seqüenciador automático ABI 3130xl. As amostras foram seqüenciadas duas ou três vezes para a confirmação dos resultados. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram então comparadas àquelas depositadas no GenBank utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>).

### 3.8 Clonagem

As amostras foram clonadas para confirmar os resultados obtidos através dos seqüenciamentos. A clonagem foi realizada pela ligação do produto da PCR no vetor pJET/blunt Cloning Vector (50ng/uL) da Fermentas Life Sciences. A etapa de transformação foi realizada em bactérias competentes JM109 da Promega, cada um dos clones foi novamente seqüenciado.

### 3.9 Análises Filogenéticas

Os cromatogramas de cada amostra foram analisados e as seqüências editadas no programa SeqmanII do pacote DNASTAR. Estas seqüências foram utilizadas na análise filogenética utilizando o programa MEGA (KUMAR et al., 2004).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análises Laboratoriais e Epidemiológicas

No período de janeiro de 2005 a julho de 2007, foram coletadas 534 amostras de pacientes **com soro** negativos para malária com suspeita clínica de dengue. Foram detectados anticorpos da classe IgM em 90 (16,8%) das amostras, confirmando a infecção recente pelo vírus dengue. O sorotipo foi identificado em 52 (57,7%) das amostras inoculadas. De 90 amostras positivas na sorologia realizou-se a amplificação pelo RT-PCR de 40 amostras (44,4%). Destas 13 (32,5%) para DEN-2, 23 (57,5%) para DEN-3 e 4 (10%) para DEN-4 (Tabela 4).

TÉCNICA	AMOSTRAS POSITIVAS/ AMOSTRAS TESTADAS (%)	DEN-2	DEN-3	DEN-4
MAC-ELISA	90/534 (16,8%)			
RT-PCR	40/90 (44,4%)	13 (32,5%)	23 (57,5%)	4 (10%)
ISOLAMENTO VIRAL	52/90 (57,7%)	15 (29%)	34 (65,3%)	3 (5,7%)

Tabela 4: Amostras testadas pelos métodos ELISA, RT-PCR e Isolamento Viral, positivas.

Além das 90 amostras positivas na sorologia também foram testadas mais 31 amostras de pacientes que não retornaram a FMTAM para a segunda coleta ou que foram negativos pelo teste ELISA, totalizando 121 amostras testadas pelo RT-PCR e Isolamento viral, (Tabela 5). Das 31 amostras todas foram amplificadas pelo RT-PCR 6 DEN-2, 21 DEN-3 e 4 DEN-4 e 26 foram positivas no isolamento viral 2 DEN-2, 23 DEN-3 e 1 DEN-4 (Tabela 6). Das 40 amostras positivas no RT-PCR 27 foram identificadas pelo isolamento viral como 6 DEN-2, 19 DEN-3 e 2 DEN-4.

Os fragmentos de 119, 290 e 390 pares de bases correspondentes aos vírus DEN-2, DEN-3 e DEN-4 respectivamente, foram visualizadas quando submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5%. No RT-PCR foram testados também soros coletados a partir do 5º dia de doença e com resultados negativos quando testados com outros métodos, obteve-se a amplificação em 28 soros destes 4 foram negativos pelos outros métodos (Gráfico 1).

TÉCNICA	AMOSTRAS POSITIVAS/ AMOSTRAS TESTADAS (%)	DEN-2	DEN-3	DEN-4
RT-PCR	71/121 (58,6%)	19 (26,7%)	44 (62%)	8 (11,3%)
ISOLAMENTO VIRAL	78/121 (64,4)	17 (24%)	57 (80,3%)	4 (5,6%)

Tabela 5: Total de amostras testadas pelos métodos RT-PCR e Isolamento viral, positivas.

TÉCNICA	AMOSTRAS POSITIVAS/ AMOSTRAS TESTADAS (%)	DEN-2	DEN-3	DEN-4
RT-PCR	31/31 (100%)	6 (19,3%)	21 (67,7%)	4 (12,9%)
ISOLAMENTO VIRAL	26/31 (83,87%)	2 (6,4%)	23 (74,2%)	1 (3,2%)

Tabela 6: Amostras de pacientes que não retornaram para a segunda coleta ou que foram negativos no teste MAC-ELISA, de 31 amostras oito foram negativas no teste MAC-ELISA.

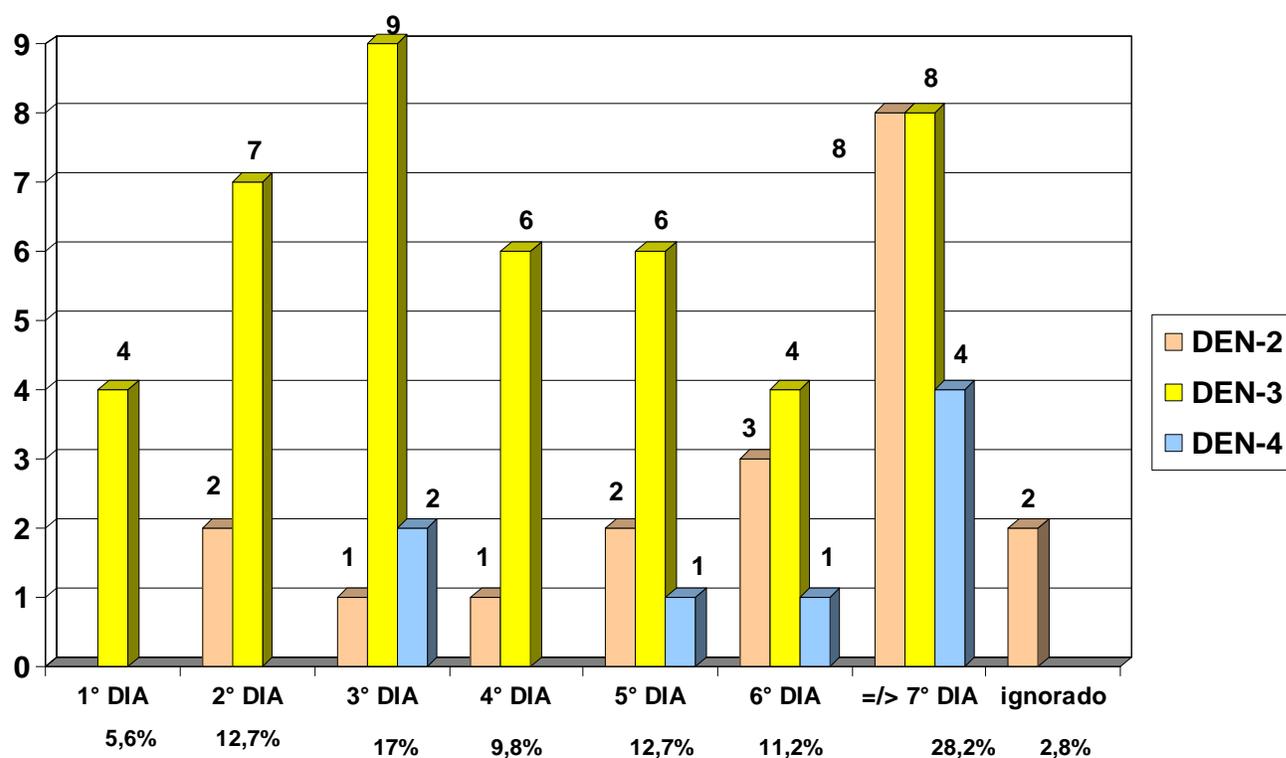


Gráfico 1: Amplificação pelo RT-PCR dos vírus dengue segundo os dias de sintomas. Considera-se o primeiro dia aquele onde começaram os sintomas.

#### 4.1.1 Distribuição dos casos segundo a faixa etária e gênero

No Gráfico 2 e 3 são mostrados o número de casos de dengue em cada faixa etária e o tipo de dengue mais comum em cada uma delas respectivamente. Os resultados referentes aos gêneros são mostrados no Gráfico 4, para esta variável foi empregado o teste estatístico de Fisher's.

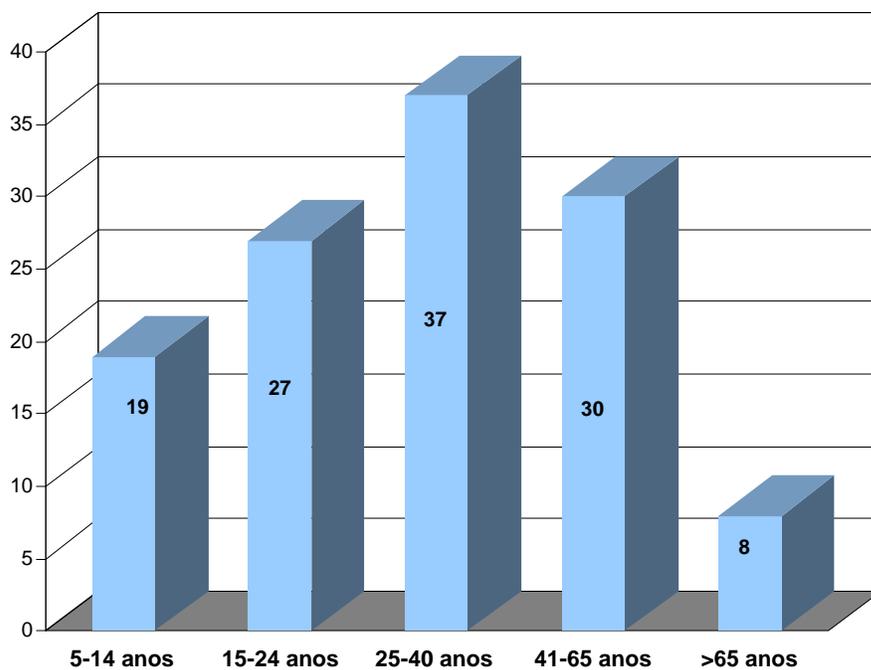


Gráfico 2. Distribuição dos casos de dengue segundo faixa etária, em qualquer um dos testes.

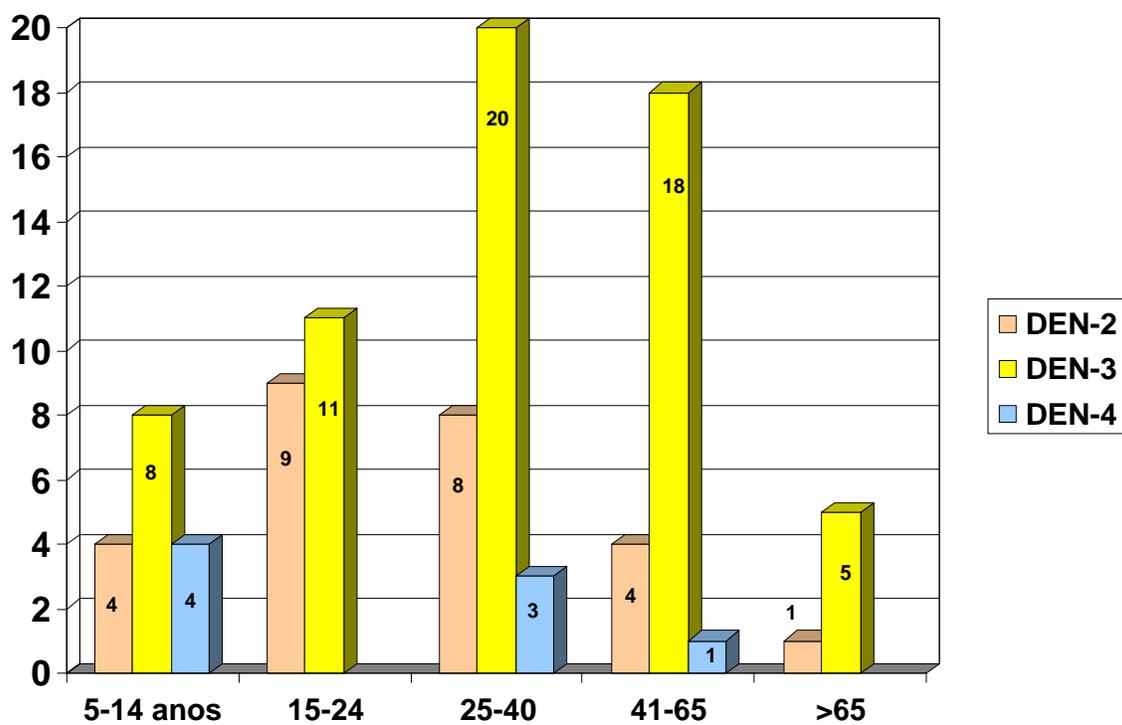


Gráfico 3. Distribuição dos sorotipos em cada faixa etária. Amostras testadas pelo RT-PCR e Isolamento viral.

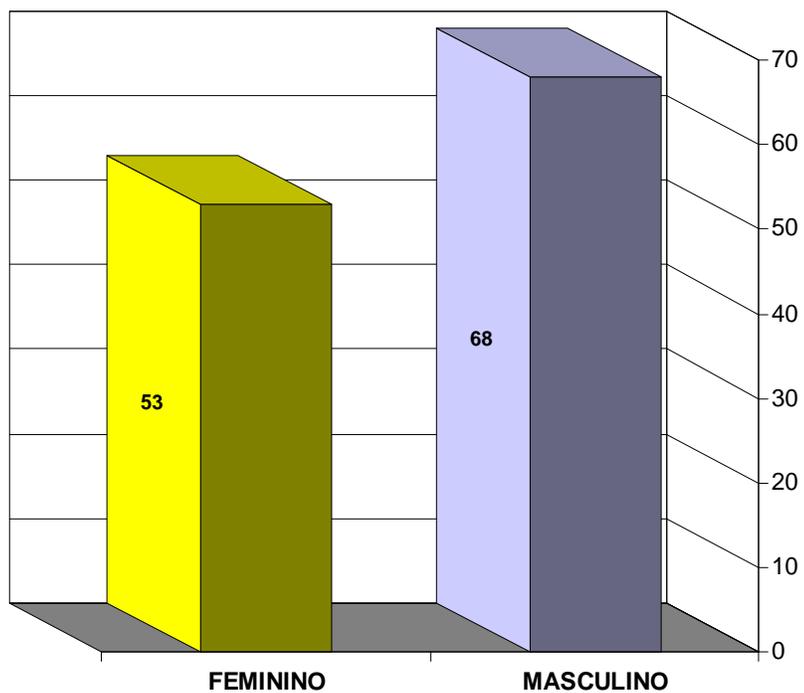


Gráfico 4. Distribuição dos casos positivos de dengue segundo o gênero, em qualquer um dos testes, foram considerados indivíduos de ambos os gêneros que procuraram o serviço da FMTAM.

#### 4.1.2 Distribuição dos casos segundo as zonas de residência.

Em relação à residência e localidade de origem, há positividade para dengue em toda a cidade de Manaus especialmente nas zonas centro-oeste, sul e oeste (Tabela 6). Pacientes em trânsito ou que estiveram fora do Amazonas até 15 dias antes do início dos sintomas também foram soropositivos para dengue (Tabela 7).

<b>ZONA</b>	<b>MAC- ELISA</b>	<b>RT-PCR DEN-2</b>	<b>RT-PCR DEN-3</b>	<b>RT-PCR DEN-4</b>
<b>SUL</b>	<b>19</b>	5	3	
<b>CENTRO-OESTE</b>	<b>16</b>	2	7	2
<b>OESTE</b>	<b>15</b>	2	6	
<b>CENTRO-SUL</b>	<b>13</b>	5	6	4
<b>NORTE</b>	<b>9</b>	1		
<b>LESTE</b>	<b>5</b>	1	3	
<b>IGNORADO</b>	<b>12</b>	3	19	2
<b>TOTAL</b>	<b>90</b>	19	44	8

Tabela 7.

Distribuição dos casos de dengue segundo as zonas de residência.

LOCALIDADE	ELISA	RT-PCR		
		DEN-2	DEN-3	DEN-4
Rondônia	1	1		
Mato Grosso do Sul		1		
Venezuela	2		2	1
Europa/ Ásia	1		1	
Rio Preto da Eva	4	1	1	
Tarumazinho	1		1	
Maués	1	1		
Inhamunda	1		1	
Estrada de Autazes		1		
Apuí	1	1		
BR-174	2		1	
Am 010	6	1	3	
Manicoré	1			
Uricurituba	1		1	
Carauari	1			
Presidente Figueiredo	2		2	
Careiro do Castanho	1		1	
Ramal Ipiranga	1		1	
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>1</b>

Tabela 8. Pacientes positivos para dengue por ELISA, RT-PCR e Isolamento Viral que estiveram em diferentes localidades.

A análise dos dados clínicos possibilitou descrever os principais sintomas apresentados e a comparação entre os sintomas apresentados pelos diferentes sorotipos (Gráfico 3; Gráfico 4).

Os sintomas descritos para as amostras positivas para co- infecção entre os vírus DEN-3 e DEN-4, são descritos no texto abaixo.

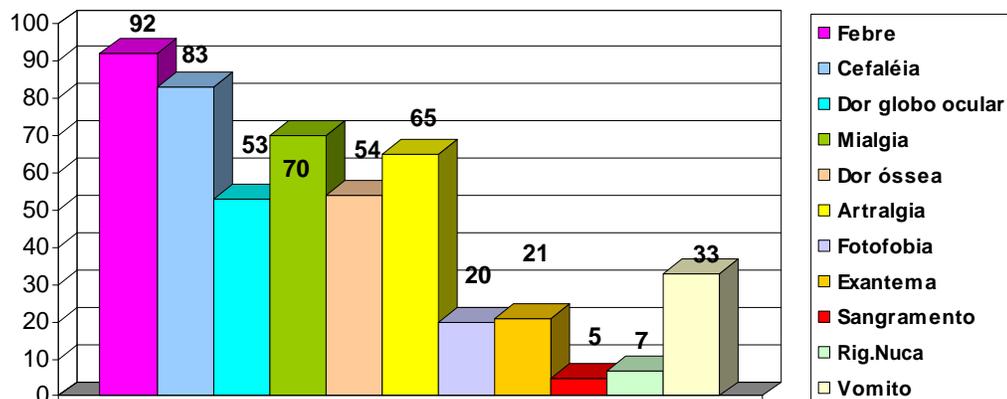


Gráfico 5. Sintomas observados nos casos de dengue em qualquer um dos testes.

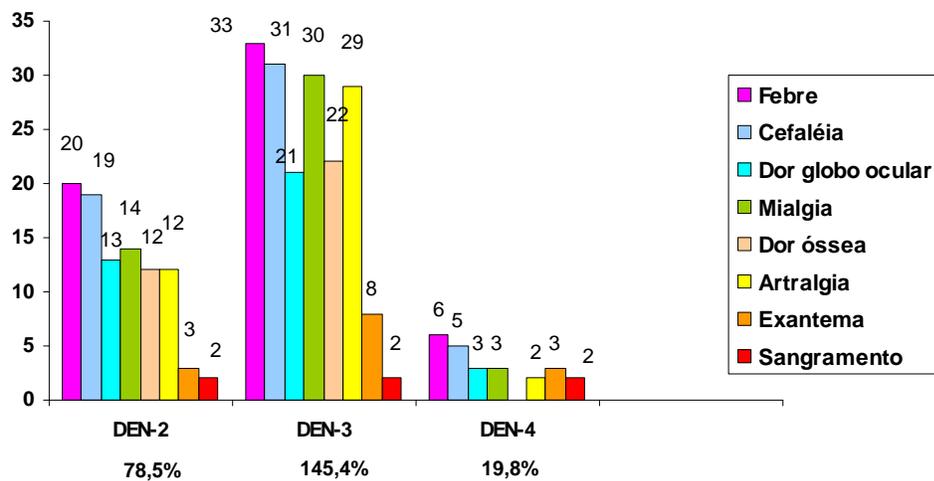


Gráfico 6. Comparação entre os sintomas apresentados por pacientes infectados pelos sorotipos DEN-2, DEN-3 e DEN-4.

As amostras AM2112 e AM750 positivas para co- infecção entre os vírus DEN-3 e DEN-4 apresentaram sintomatologia mais grave, quando analisamos o prontuário os seguintes dados laboratoriais foram registrados:

AM2112- contagem de plaquetas 120 mil, diagnóstico clínico dengue com complicação.

AM750- desorientação; anúria; petéquias; choque hipovolêmico; odinofagia, redução do hematócrito 48,4; plaqueta maior que 114.000.

## 4.2 Análises Genéticas

Para as análises genéticas foram obtidas um total de 35 seqüências obtidas pelo RT-PCR, das quais foram detectadas 6 para Dengue 4 e 29 para Dengue 3. Os produtos obtidos após o seqüenciamento foram compostos por fragmentos de aproximadamente 309 pares de bases para Dengue 4, e 206 e 418 pares de bases para Dengue 3. A média da composição de bases desses fragmentos foi de T 22,9%, C 21,8%, A 30,6% e G 24,7%. O banco de dados das seqüências com os sítios variáveis pode ser visualizado no Anexo VI. A distância genética (distância *P* não corrigida) entre as seqüências dentro de cada sorotipo foi de 0,4% para Dengue 3 e 0,10% para Dengue 4. Os valores de distância entre os sorotipos podem ser visualizados na Tabela 8, os quais evidenciam altos valores entre os mesmos.

	Dengue 1	Dengue 2	Dengue 3	Dengue 4	AM2112*
Dengue 1	0	0,043	0,043	0,046	0,046
Dengue 2	0,385	0	0,044	0,043	0,038
Dengue 3	0,329	0,368	0	0,046	0,048
Dengue 4	0,404	0,350	0,394	0	0,033
AM2112*	0,422	0,243	0,403	0,149	0

Tabela 9. Distância genética (Distância *P* não corrigida) com desvio padrão (valores acima) para cada comparação par a par dos grupos de dengue.

\* Positiva para DEN-3/4, e com uma seqüência genômica correspondente ao DEN-2, indicando ser um caso de recombinação natural.

A razão de substituições de nucleotídeos do tipo transição ou transversão e mostrado na Tabela 9.

	A	T	C	G
A	-	<i>0.43</i>	<i>0.54</i>	<b>24.09</b>
T	<i>0.75</i>	-	<b>19.53</b>	<i>0.49</i>
C	<i>0.75</i>	<b>15.37</b>	-	<i>0.49</i>
G	<b>36.59</b>	<i>0.43</i>	<i>0.54</i>	-

Tabela 10: Estimativa da razão de substituições de nucleotídeos.

NOTA: Cada coluna mostra a probabilidade de substituição de uma base (linha) para outra base (coluna) instantaneamente. Apenas colunas dentro de uma linha devem ser comparadas. Diferentes taxas de substituições do tipo transição são mostrados em negrito e substituições do tipo transversão são indicadas em itálico. As frequências de nucleotídeos são 0,339 (A), 0,193 (T / E), 0,245 (C), e 0,223 (G). As taxas de transição/ transversão são  $k_1 = 48,906$  (purinas) e  $k_2 = 36,036$  (pirimidinas). A transição global / transversão viés é de  $R = 17,238$ , em que  $R = [A * G * k_1 + T * C * k_2] / [(A + G) * (T + C)]$ . A posição de cada códon foi incluído 1<sup>o</sup> + 2<sup>a</sup> + 3<sup>a</sup> + Noncoding. Todas as posições contendo lacunas e falta de dados foram eliminados dos dados (Completa supressão). Havia um total de 148 posições no final do conjunto de dados. Todos os cálculos foram conduzidos no MEGA 4.

#### **4.2.1 Análises Filogenéticas**

As seqüências de dengue 3 e dengue 4 apresentaram 98% de similaridade com a seqüência AY679147BR (Dengue 3), e AY947539 (Dengue 4), respectivamente. Através das seqüências obtidas após o seqüenciamento foi possível obter-se uma árvore de distância de Neighbor-Joining com as relações filogenéticas entre os sorotipos isolados em Manaus e aqueles depositados no GenBank (NCBI) (Figura 4).

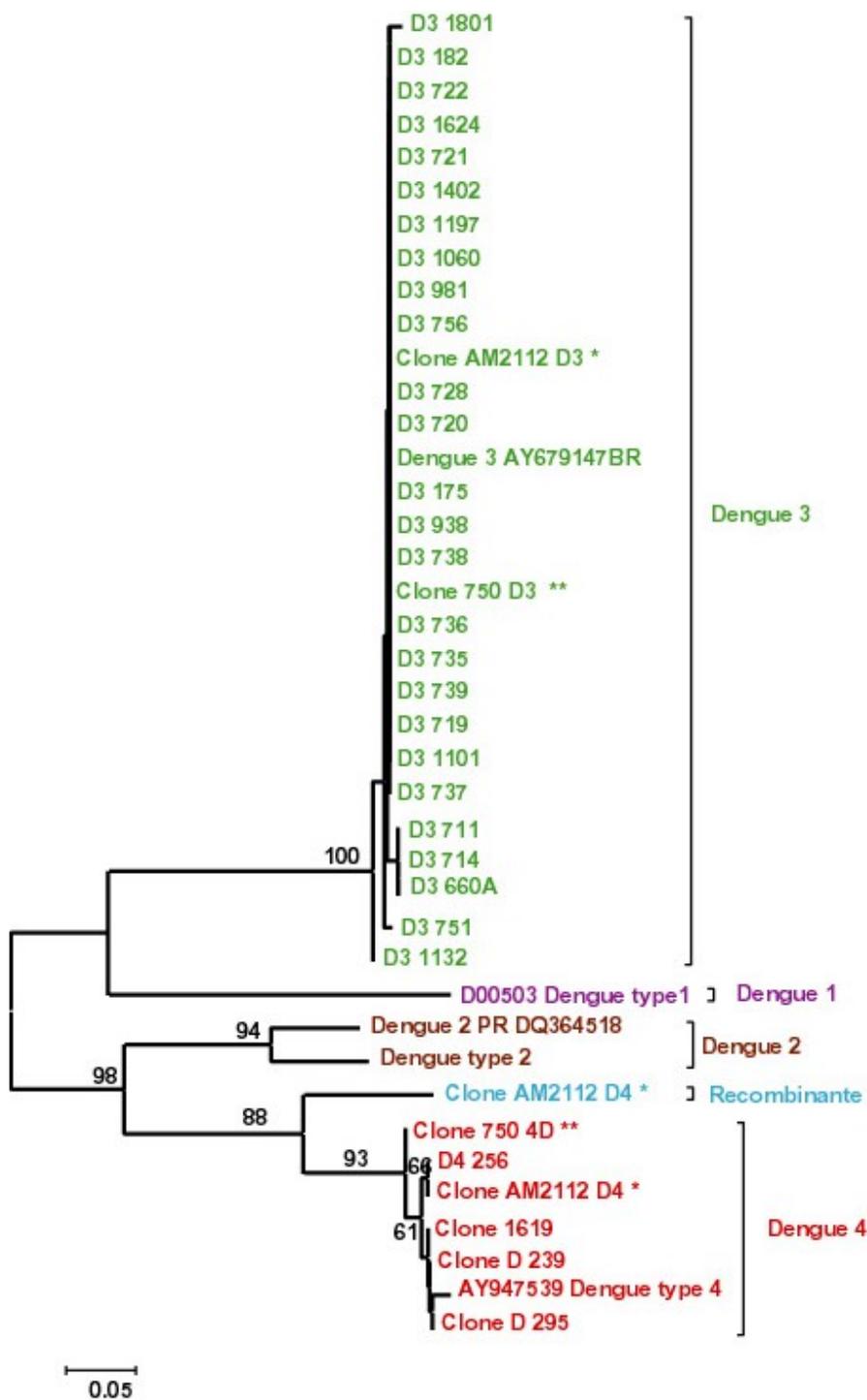


Figura 4. Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA modelo Neighbour- joining. \* indivíduo AM2112 com caso de Dengue 3, 4 e Recombinante; \*\* indivíduo 750 com caso de Dengue 3 e 4. Os valores acima dos braços são valores de *bootstrap*, foram considerados os valores acima de 50%.

### 4.2.2 Co-infecção

A co-infecção foi observada em três amostras duas delas autóctones, com os sorotipos DEN-4/DEN-2 e DEN-3/DEN-4 (Tabela 11), o RT-PCR foi confirmado pelo isolamento dos vírus em células C6/36. A co-infecção com DEN-3 e DEN-4 mais uma vez foi detectada, em uma amostra (AM2112) de paciente proveniente da Venezuela. A presença de anticorpos IgM indicou a infecção por dengue por RT-PCR foram visualizadas as bandas correspondentes aos sorotipos DEN-3 e DEN-4 (Figura 5), identificando a presença de co-infecção associada a DHF, neste caso a detecção do sorotipo em cultura de células não foi possível, devido a contaminação do fluído de células inoculado.

Tabela 11. Amostras positivas para co – infecção.

<b>AMOSTRAS</b>	<b>DIAS DE DOENÇA</b>	<b>MAC-ELISA</b>	<b>ISOLAMENTO VIRAL</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>SEQUENCIAMENTO</b>
AM750	09	negativo	DEN-3/DEN-4	DEN-3/DEN-4	DEN-3/DEN-4
AM1619	06	positivo	DEN-2/DEN-4	DEN-2/DEN-4	DEN-4
AM2112	05	positivo	–	DEN-3/DEN-4	DEN-3/DEN-4

O seqüenciamento destes casos confirmou a infecção simultânea com exceção da amostra 1619 onde não foi obtida a seqüência de DEN-2. O produto das reações de clonagem

foi seqüenciado confirmando a co-infecção com os vírus DEN-4 e DEN-3. Estas seqüências de nucleotídeos foram depositadas no GenBank com o número de acesso EU127898 (AM750-D3), EU127899 (AM750-D4) e EU127900 (AM1619).

Na Figura 5 observamos as amostras AM750 e 1041 esta última foi positiva apenas para DEN-4 em todas as reações.

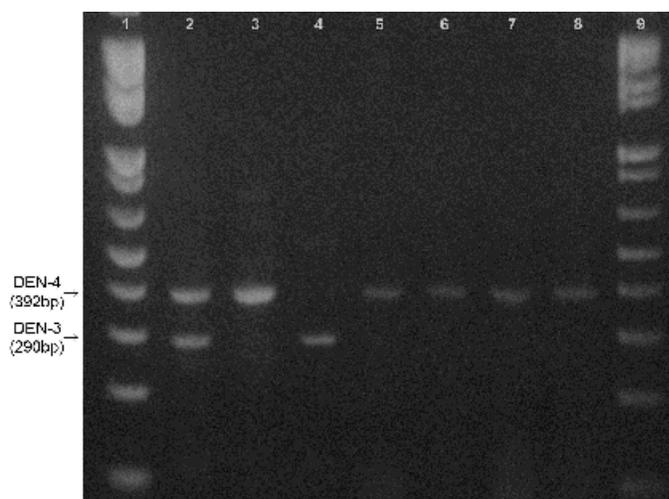
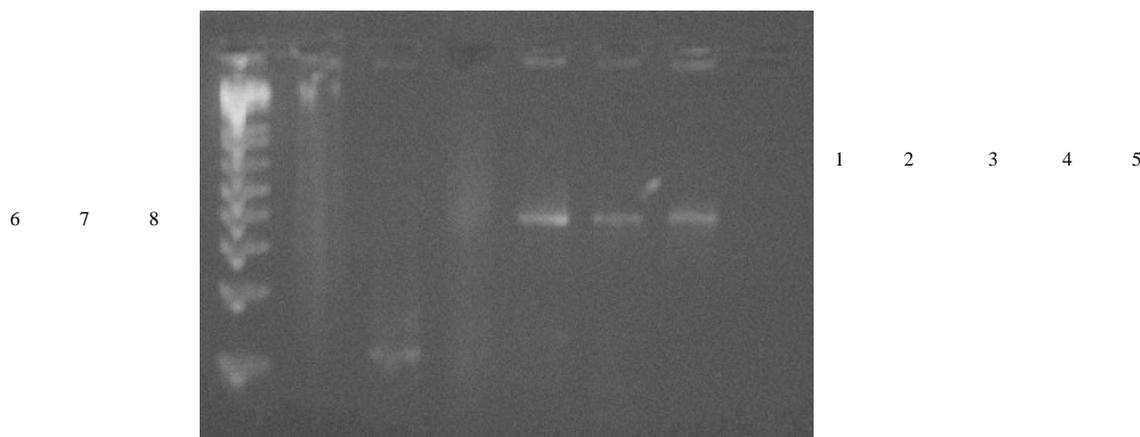


Figura 5. **Deteção de co- infecção (DEN-3/DEN-4), DEN-3 e DEN-4 em gel de Agarose.** Linhas 1 e 9: Padrão de peso molecular (Invitrogen) 1 Kb; Linha 2: AM750 multiplex-PCR; Linha 3: AM750 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 4: AM750 PCR com iniciador para DEN-3; Linha 5: AM1041 multiplex-PCR; Linha 6 AM1041 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 7: AM1619 multiplex- PCR; e Linha 8: AM1619 PCR com iniciador para DEN-4.

É importante destacar que as amostras AM1619 e AM2112 com a reação de Nested (Multiplex-PCR) apenas apresentaram o fragmento correspondente ao DEN-2 e DEN-3 respectivamente, o seqüenciamento revelou a presença do DEN-4, contudo, quando a reação de Nested PCR foi feita com iniciadores separados D1+TS2; D1 + TS3; D1+DEN-4 foi possível visualizar as bandas correspondentes a cada sorotipo (Figura 6).



DEN-4  
390 pb

DEN-2  
119 pb

Figura 6. Detecção do DEN-2 e DEN-4 em gel de Agarose. Linha 1 : Padrão de peso molecular (Invitrogen) 100 pb; Linha 2: \*AM1619 multiplex-PCR; Linha 3: AM1619 multiplex-PCR; Linha 4: \*AM1619 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 5: AM1619 PCR com iniciador para DEN-4; Linha 6 e 7: AM2112 com iniciador para DEN-4; Linha 8: Controle negativo.

\* O produto da primeira reação de PCR não foi diluído 1:100.

O manuscrito que apresenta os primeiros casos de DEN-4 no Amazonas foi submetido a revista *Emerging Infectious Diseases* intitulado “**Emergence of Dengue Type 4 Virus in Manaus, Amazonas, Brazil**”. O aceite e o manuscrito estão no anexo VII e VIII, respectivamente.

### 4.2.3 Recombinação

A amostra AM2112 procedente da Venezuela além de apresentar a co-infecção com os sorotipos DEN-3 e DEN-4, durante a análise das seqüências obtidas para DEN-4 foi detectado uma seqüência genômica correspondente ao sorotipo DEN-2, indicando ser este um caso de recombinação natural. Este sorotipo não foi detectado em nenhuma das reações de PCR realizadas para esta amostra, mesmo aquelas usando somente os iniciadores para DEN-2. Na Figura 7 é apresentada esta amostra como clone RNG e clone quimera, até 160 a seqüência é semelhante a DEN-4 em seguida observamos uma seqüência de DEN-2.

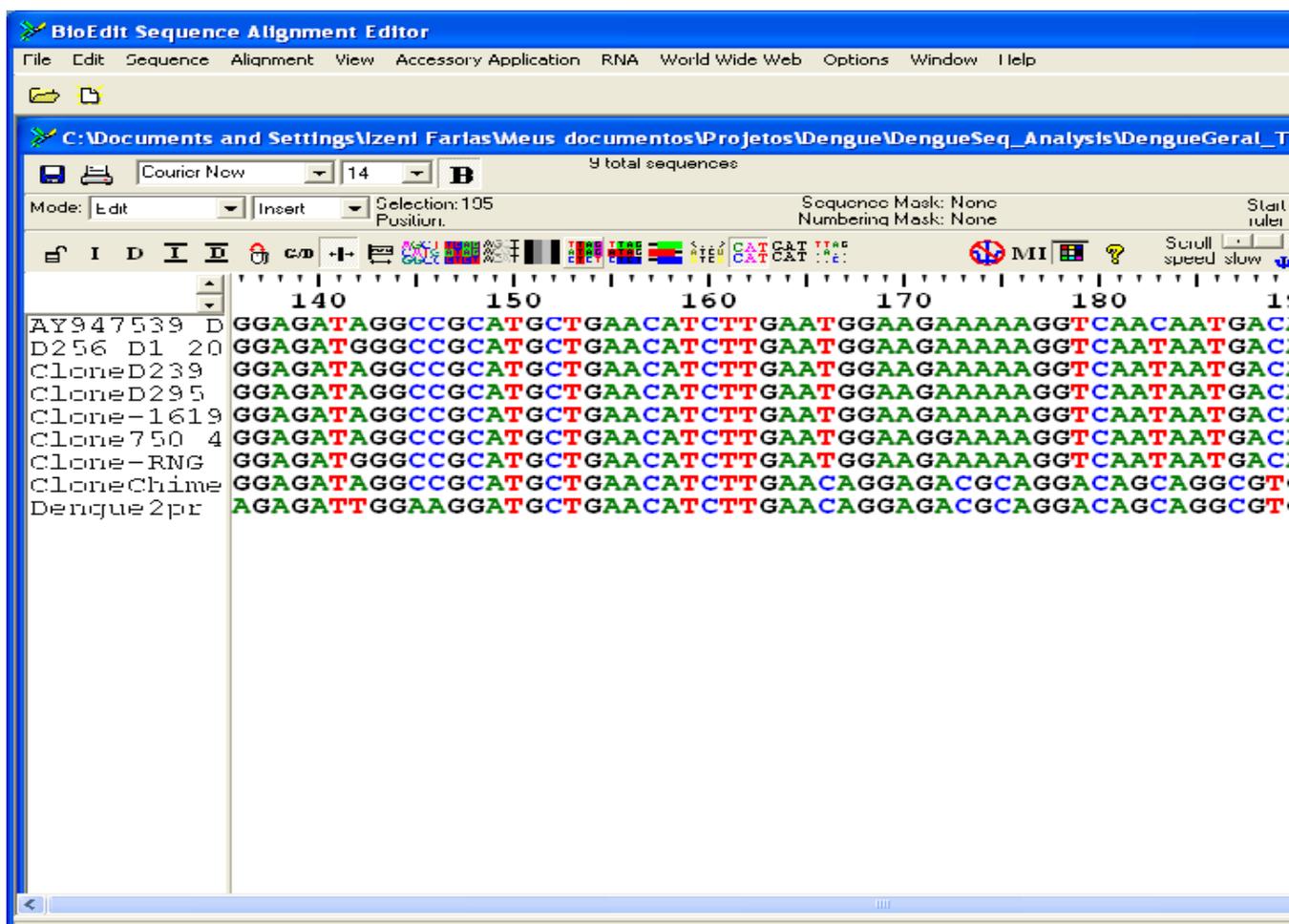


Figura 7. Sequência alinhadas dos clones positivos para DEN-4.

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1 ANÁLISES LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICAS**

No Brasil os casos de febre hemorrágica do dengue (DHF) ocorreram após a introdução do DEN-2 no Estado do Rio de Janeiro, a confirmação de dengue hemorrágico por DEN-2 ocorreu após uma epidemia pelo DEN-1 ocorrida há quatro anos (DIAS et al., 1991; ZAGNE et al., 1994). Este mesmo padrão foi observado em Cuba durante a epidemia de 1981 com a infecção seqüencial por dois sorotipos (DEN-1 e DEN-2), e um intervalo de seis meses a cinco anos aproximadamente (KOURI et al., 1986).

A dinâmica da epidemia do dengue no Amazonas é semelhante ao ocorrido em outras regiões do Brasil e da América. Em Manaus – Amazonas os primeiros casos autóctones de dengue foram registrados em março de 1998, por estudos sorológicos permitindo o diagnóstico da primeira epidemia de dengue (FIGUEIREDO et al., 2004). No ano de 2001 foi possível identificar o sorotipo DEN-1 como o agente causador daquela epidemia (FIGUEIREDO et al., 2002). Naquele mesmo ano, casos de febre hemorrágica do dengue foram registrados no Estado do Amazonas, com o isolamento viral do DEN-2 (FIGUEIREDO et al., 2002). Em 2002 foi isolado pela primeira vez o sorotipo DEN-3 de um paciente procedente da Bahia, a partir daí casos autóctones foram diagnosticados por isolamento viral (FIGUEIREDO et al. 2003).

Neste trabalho foi identificado pela primeira vez o vírus DEN-4 em Manaus de casos autóctones. Este vírus foi detectado durante a primeira epidemia registrada no Brasil em Boa Vista- Roraima em 1981-1982. Naquela ocasião o sorotipo DEN-1 também foi encontrado (OSANAI, 1984) desde então nenhum isolado de DEN-4 foi registrado em nenhuma outra parte do país. Durante a realização deste projeto verificou-se, como pode ser observado nos resultados apresentados, que não houve amostras positivas para DEN-1. O número de

amostras positivas para DEN-2 é menor em relação ao DEN-3 e a identificação autóctone do DEN-4.

## **5.2 Identificação pelo isolamento viral e PCR dos vírus X Período de Doença**

Considerando o ciclo de doença, a maior parte dos isolamentos foram obtidos nos 3º, 2º e 4º dia, respectivamente, confirmando que a maior positividade para o isolamento viral não excede o 5º dia de viremia, coincidindo com a queda no número de partículas virais infecciosas e a elevação do título de anticorpos neutralizantes séricos. Em Cuba observou-se que a metade dos isolamentos foi obtida em amostras colhidas no 4º dia (GUZMÁN et al., 1984).

O mesmo não é observado pela técnica RT-PCR onde, é possível obter a amplificação dos vírus dengue mesmo no período de convalescença. De acordo com Lanciotti et al. (1992) nesta metodologia os anticorpos não interferem sendo possível com isso saber qual o sorotipo circulante mesmo após o período de viremia.

Neste trabalho esta situação foi evidenciada quando analisamos as amostras positivas para co-infecção. Segundo relatado pelo paciente ou acompanhante, estes apresentavam no momento da primeira coleta mais de 7 dias do início dos sintomas, e ainda assim conseguiu-se o isolamento do vírus em cultura de células. Há a possibilidade de levar em conta a carga viral que nesta pesquisa não foi quantificada assim como considerar a possibilidade de haver confusão por parte do paciente em relação a data do início dos sintomas. Isto foi particularmente importante em relação à amostra AM750, que apresentou sorologia negativa, mas foi positiva para os outros testes, neste caso em particular, foi preciso considerar a história clínica deste paciente, se era portador de asma, diabetes, ou de alguma doença do sistema imune. Além da infecção secundária, sugeriu-se a asma brônquica e a diabetes como fatores de risco para a DHF (GUZMÁN et al., 1999).

### **5.3 Identificação do vírus X Faixa Etária**

Em relação à faixa etária indivíduos entre 15-24, 25-40 e 41-60 anos apresentaram maior positividade, confirmando o observado anteriormente durante a primeira epidemia de dengue em Manaus (FIGUEIREDO et al., 2004) e em estudos realizados por Bastos (2003) e Castro (2004). A exposição ao vírus dengue é maior na faixa etária acima de 15 anos enquanto a população de idosos vai se imunizando durante os anos, diminuindo o número de indivíduos susceptíveis mais velhos, como descrito por Teixeira et al. (2005) e demonstrado anteriormente em epidemias em Cuba (GUZMÁN et al., 1999).

Quanto ao gênero os pacientes do sexo masculino foram os mais acometidos ou que procuraram em número um pouco maior a FMTAM, segundo o teste estatístico de Fisher's não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. No entanto, ambos foram infectados pelo vírus dengue, como observado nas pesquisas realizadas em Manaus e por outros autores (VASCONCELOS et al., 1993 & VASCONCELOS et al., 1998).

#### 5.4 Identificação viral X Localização Geográfica

Foi observado que os bairros da zona Centro-Oeste, Sul e Oeste foram os mais afetados, são bairros com melhor infra-estrutura, serviço médico, localização geográfica próxima a FMTAM e a outras unidades de saúde, e que compreendem a maior parte da população com melhores condições socioeconômicas por isso com maior acesso aos serviços de saúde. Estes resultados são semelhantes aos observados desde a primeira epidemia de dengue onde os bairros da zona Sul da cidade, próximos ao Rio Negro, provável sítio de entrada tanto para o vetor quanto para o vírus, foram os primeiros e os mais afetados (FIGUEIREDO et al., 2004), e aqueles descritos por Bastos em 2003 e Castro em 2004. Em outros Estados, a alta ocorrência da doença foi igualmente observada em bairros mais favorecidos sendo atribuída à presença de utensílios descartáveis e a vasos de plantas aquáticas nas residências que servem de criadouros para o mosquito *A. aegypti* (VASCONCELOS et al., 1998).

O município de Manaus apresentou o maior número de casos positivos, mas também coletamos material de pacientes em trânsito ou que estiveram fora de Manaus ou do Amazonas até 15 dias antes dos sintomas. O Amazonas está situado no centro da Região Norte do Brasil, limitando-se ao norte com o Estado de Roraima, Venezuela e Colômbia; a leste com o Estado do Pará; a sudeste com o Estado do Mato Grosso; ao sul com o Estado de Rondônia e a sudoeste com o Estado do Acre e o Peru (VIVERDE TURISMO). A proximidade com outros países onde o DEN-4 é endêmico como Venezuela e Colômbia pode ter influenciado a detecção deste sorotipo primeiro no Amazonas. Além da localização geográfica, por ser hoje uma cidade com o turismo ecológico em desenvolvimento, além do Pólo Industrial de Manaus, com mais de 450

fábricas de grande, médio e pequeno porte (PORTAL AMAZÔNIA), que atrai investidores de várias partes do mundo. Manaus recebe várias pessoas destes e de outros estados e países.

É importante lembrar que o sorotipo DEN-3 foi detectado pela primeira vez em Manaus de um paciente procedente de Salvador-Bahia (FIGUEIREDO et al., 2003).

### **5.5 Manifestações Clínicas.**

Na análise dos dados clínicos os sintomas observados são os mesmos descritos para dengue, estes resultados estão de acordo com os de outros autores (VASCONCELOS et al., 1993), embora tenha sido registrado com frequência cada vez maior, casos de comprometimento do sistema nervoso central (NOGUEIRA et al., 2002), comprometimento hepático, esplênico e miocardiopatia (HALSTEAD, 1990).

Não foi possível observar manifestações clínicas mais severas em relação aos sorotipos, exceto para duas amostras que apresentaram co-infecção com os sorotipos DEN-3 e DEN-4 conforme mostrado nos resultados, observa-se maior número de sintomas para DEN-3 porque este sorotipo foi o mais freqüente. Diferentemente, Passos et al. (2004) verificaram diferenças clínicas em pacientes infectados durante a epidemia de 2001/2002 no Rio de Janeiro, naquela ocasião foi constatado que indivíduos infectados com DEN-3 apresentavam sintomatologia mais grave, sugerindo maior virulência a este sorotipo.

A detecção de três sorotipos e a frequência maior do DEN-3 mostram que a maior parte da população está imune aos vírus DEN-1 e DEN-2. Segundo a teoria da infecção seqüencial pelos vírus do dengue (HALSTEAD, 1988), seriam esperados casos de DHF em Manaus. No entanto, em nossa pesquisa apenas dois casos de DHF foram associados ao sorotipo DEN-3, mas ambos foram casos de co-infecção com o sorotipo DEN-4.

Situação semelhante foi observada na Colômbia (OCAZIONEZ et al., 2006), durante os dois anos seguintes a re-introdução do DEN-3 em 2001, 4046 casos de dengue foram associados a este sorotipo, mas somente casos de dengue clássico foram observados em indivíduos com infecção secundária ao contrário daqueles indivíduos com infecção primária o DEN-3 esteve associado a DHF. Tais resultados sugeriram que as cepas de DEN-3 circulantes na Colômbia são mais patogênicas entre indivíduos sem imunidade ou que uma alta proporção de indivíduos com imunidade cruzada devido a outros sorotipos podem ser protegidos da infecção severa por dengue. O mesmo foi observado na Venezuela onde um grande número de casos de dengue ocorreram após a reintrodução do DEN-3, porém com maior frequência de DF (UZATEGUI et al., 2003).

Contudo, no Brasil o DEN-3 após dois anos de sua introdução foi associado a uma severa epidemia devido às manifestações clínicas e ao número de óbitos (NOGUEIRA et al., 2005). Desta forma, não podemos afirmar que em Manaus a falta de associação entre o DEN-3 e casos de DHF sejam ocasionados pelos mesmos fatores observados na Colômbia e Venezuela, devemos considerar a virulência da cepa circulante, os fatores individuais e epidemiológicos.

Em relação ao vírus DEN-4 observamos a mesma sintomatologia apresentada nos casos de DEN-2 e DEN-3, com exceção dos casos citados de co-infecção com DEN-3, os demais pacientes positivos para DEN-4 apresentaram quadro clínico característico de dengue clássica.

## 5.6 Co-infecção

Em outro caso de co-infecção entre os vírus DEN-2/4 a sintomatologia foi característica de dengue clássico. Somente os dois casos citados acima entre DEN-3/4 apresentaram um quadro clínico característico de DHF confirmado clínica e laboratorialmente segundo os critérios da World Health Organization (WHO, 1997). É preciso considerar em relação à amostra AM2112, procedente da Venezuela, que este país possui os quatro sorotipos e a transmissão e infecção humana por vários vírus dengue, o que aumenta o risco para DHF (RICO HESSE et al., 1997; WATTS et al., 1999). Entretanto, outros fatores devem ainda ser considerado além da virulência, entre eles aquele relacionado ao próprio hospedeiro: idade, raça, enfermidades crônicas como asma, diabetes e anemia falciforme (HALSTEAD et al., 1970; GUZMÁN, 2005).

A co-infecção autóctone no Brasil foi descrita pela primeira vez em 2001 na cidade de Barretos - São Paulo com os sorotipos DEN-1 e 2 em um paciente que apresentava DF (SANTOS et al., 2003). Outro caso de co-infecção ocorreu em 2005 entre DEN-2 e 3 durante uma epidemia no Ceará, o paciente apresentava DF e se recuperou totalmente (ARAÚJO et al., 2006). Dengue clássica sem complicações em casos de co-infecção tem sido observada também por outros autores contrariando a hipótese que a infecção simultânea com os vírus dengue permitem o aparecimento da forma mais severa da doença (GUBLER et al., 1985; SANTOS et al., 2003). Considerando que os sorotipos DEN-2 e 3 podem levar a DHF, no Brasil, entretanto não há registros de DHF associado à infecção simultânea.

Como podemos evidenciar o sorotipo DEN-4 esteve associado a **oito** casos sendo três deles co-infecção, não evidenciamos sintomatologia mais grave nos casos de infecção individual por este sorotipo ou associado ao sorotipo DEN-2. Situação semelhante tem sido observada desde sua introdução nas Américas em 1981. A cepa designada como subtipo II rapidamente foi distribuída

por toda região causando DF, porém somente casos esporádicos de DHF/DSS (GUBLER, 1998). No Brasil durante o surto ocorrido em Roraima, todos os casos tiveram evolução benigna e há evidências que a transmissão ocorreu a partir de pessoas infectadas no Caribe, Colômbia e/ou Suriname (OSANAI, 1984).

Na Colômbia casos de DHF foram mais freqüentes em pacientes infectados por DEN-2 do que por DEN-3 ou 4 (OCAZIONEZ et al., 2006). Sabe-se que no México os vírus DEN-4 tem sido associado com DF (MONATH et al, 1996), no entanto, este sorotipo também foi implicado em epidemias de DHF em 1984 (LORONO et al., 1993) e a um caso fatal de DHF (RAMOS et al., 1998).

Durante a epidemia ocorrida em Roraima à identificação dos sorotipos DEN-1 e 4 foi realizada através de técnicas sorológicas e do isolamento viral. Em nosso estudo os sorotipos DEN-2, 3 e 4 foram detectados por diferentes técnicas, nossa preocupação com a identificação do DEN-4 aumentou o cuidado com a exatidão dos resultados assim. Repetimos a PCR, o seqüenciamento e ainda clonamos os amplicons para seqüenciarmos novamente, para que nenhuma dúvida pairasse sobre nossos resultados. Em 1981/82 essas tecnologias ainda não estavam disponíveis com a mesma facilidade de hoje, e como o próprio autor (OSANAI, 1984) cita foi uma situação emergencial, em frente a uma epidemia. Fica claro, portanto, que as técnicas clássicas de sorologia e isolamento viral, são muito importantes em um estudo, mas é necessário confirmar estes resultados com as metodologias hoje existentes que além de serem mais rápidas podem auxiliar na conclusão dos casos clínicos que não foram elucidados pelas técnicas clássicas.

Neste ponto ressaltamos mais uma vez que para as amostras com co-infecção durante as reações de Nested PCR com todos os iniciadores de tipagem em uma única reação, somente os

outros sorotipos eram visualizados no gel de agarose. É provável que os títulos virais de DEN-3 e DEN-2 fossem mais elevados do que DEN-4. Somente no isolamento viral e no PCR com iniciadores específicos usados separadamente foi possível detectar este vírus, isto deixa claro a frequência cada vez maior do sorotipo DEN-3 e a introdução e estabelecimento de um novo sorotipo.

### **5.7 Recombinação**

As análises de seqüências do genoma dos vírus dengue mostram que a recombinação é um importante mecanismo responsável pela diversidade dos vírus dengue (HOLMES et al., 1999; TOLOU et al., 2001; WOROBEY et al., 1999) embora as trocas genéticas entre as cepas raramente são registradas em vírus RNA fita simples de polaridade positiva (LAI, 1992). Este mecanismo associado à mutação pode ser um importante fator envolvendo variação genética dos vírus dengue. Santos et al. (2003) sugere que o papel da recombinação na diversidade dos vírus dengue deve ser investigado, e as cepas isoladas de casos de co-infecção natural podem ser bons modelos para estes estudos.

O primeiro registro de recombinação em populações naturais do vírus DEN-1 foi observada na cepa brasileira (BR/90), isolada de um paciente com DF na epidemia do Rio de Janeiro em 1990/91, e na cepa da Guiana Francesa (FGA/89), coletada de um paciente com DF (ambos os vírus foram descritos por Desprès, Frenkiel, e Deubel 1993). Para ambas as cepas a análise identificou as seqüências de Jamaica e Singapura como mais próximas para os diferentes segmentos recombinantes. Não se sabe se a recombinação ocorre em hospedeiro co-infectado com múltiplas cepas ou dentro do mosquito vetor que se alimenta em diferentes hospedeiros. Contudo, quando os vírus infectam uma única célula, é possível que a recombinação ocorra

através do mecanismo de escolha da cópia se a RNA polimerase realizar trocas entre os genomas durante a replicação viral (HOLMES et al., 1999).

A análise do genoma completo, especialmente dos genes do capsídeo e de membrana, em um estudo realizado na Venezuela, propôs que os vírus DEN-2 isolados podem ser recombinantes, especialmente a cepa MARA4 que varia de acordo com a região do gene usada para análise, provavelmente devido à circulação na mesma localidade ocasionando a co-infecção dos genótipos Asiático e Americano (UZCATEGUI et al., 2001). Neste estudo não foram observadas diferenças entre as cepas de DF ou DHF/DSS na sequência do gene E, sugerindo que este gene sozinho não pode determinar a severidade da doença, estes resultados estão de acordo com outros estudos sobre os genótipos asiáticos de DEN-2, (LEITMEYER et al., 1999), logo na expressão da doença deve-se considerar outros fatores tais como, ambientais e do hospedeiro.

Em nossos resultados verificamos uma forte evidência para a recombinação entre diferentes sorotipos de uma amostra coletada de paciente procedente da Venezuela, este tipo de recombinação é considerado raro já que os sorotipos diferem substancialmente na sequência. Contudo, este tipo de recombinação pode ter um papel importante no desenvolvimento de cepas com novas propriedades fenotípicas, incluindo o aumento na virulência e potencial de transmissão (HOLMES et al., 1999).

Toda evidência de recombinação nos vírus dengue tem sido por análise comparativa de sequências, via a identificação de árvores filogenéticas incongruentes. Contudo, esta ferramenta tem sido usada para detectar a recombinação e tem sido usada em muitos sistemas virais. É claro que há críticas em relação à avaliação filogenética (HOLMES & TWIDDY, 2003; CRAIG et al., 2003), contudo ela pode detectar a recombinação entre sequências que são relativamente divergentes. Sob este critério a evidência de recombinação em dengue é forte (HOLMES &

TWIDDY, 2003; CRAIG et al., 2003). Além disso, não há nenhuma razão biológica para que os vírus dengue não recombinem. De fato, a recombinação tem sido demonstrada em outros membros da família *Flaviviridae* (COLINA et al., 2004), e o grande número de humanos e mosquitos infectados com o vírus dengue pode resultar em recombinações (HOLMES, 2006).

## 5.8 ANÁLISE EVOLUTIVA

Por seqüenciamento foi demonstrada a distância genética entre os sorotipos como observado na Tabela 8, demonstrando altos valores entre eles, nossos resultados corroboram com os dados que indicam 7% de homologia entre os sorotipos (KOURI, 1997). Em relação aos genótipos o máximo de divergência de nucleotídeos encontrada no gene que codifica a proteína E foi de 20% para DEN-2, 12,3% para DEN-3, 6,9% para DEN-1 e 4,9% para DEN-4, a razão de mutação randômica foi de 0,1-0,2% por ano nos vírus dengue, indicando evolução genética muito baixa, refletindo a pressão e limitação sobre a evolução do vírus dengue imposta pela necessidade do mesmo ser replicado em mosquitos e humanos (WEAVER et al., 1991).

A porcentagem maior das bases adenina e guanina podem indicar mutações do tipo transição, substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra, ao contrário das transversões em que uma purina é substituída por uma pirimidina ou vice-versa, o primeiro tipo é mais freqüente e foi observada em outros trabalhos realizados com o vírus dengue (FONG et al., 1998). Outros trabalhos observaram mudanças de nucleotídeos em 38 posições da região seqüenciada E/NS1 onde a maioria das substituições de códon foram do tipo silenciosas, pois não houve mudanças nas seqüências de aminoácidos (FONG et al., 1998). Nossos resultados referentes a substituição de nucleotídeos indicando mutações do tipo transição eram esperados, pois as proteínas C-prM são regiões muito conservado dos vírus dengue.

Os vírus RNA sofrem várias mutações, a razão de mutação não tem sido medida diretamente nos vírus dengue, estimativas de  $\sim 1 \times 10^{-3}$  substituições por sítio, por ano são da mesma ordem de magnitude vistas em outros vírus RNA (HOLMES, 2006). Quando se une a alta razão de replicação e o tamanho de população, as elevadas razões de mutação significam que os vírus dengue mostram abundante variação genética, dentro e entre os hospedeiros, mas não significa necessariamente que estes vírus formam quasiespecies (presença de várias populações virais em um mesmo hospedeiro) (LIN et al., 2004; WANG et al., 2000). Na realidade o que define quasiespecies é uma forma particular de mutação – seleção mais do que a presença de diversidade genética (HOLMES, 2006).

A presença de quasiespecies em um mesmo hospedeiro tem sido demonstrada (WANG et al., 2002), também tem sido comprovada a recombinação entre as cepas possivelmente devido à circulação simultânea de genótipos diferentes de um sorotipo em um mesmo hospedeiro (TWIDDY & HOLMES, 2003; HOLMES & TWIDDY, 2003).

Os genótipos de dengue não são entidades fixas (HOLMES et al., 1999). A recombinação tem sido documentada dentro de todos os quatro sorotipos, mas não é claro como ela tem determinado a evolução do vírus, embora o torne mais eficiente para explorar e adaptar-se mais eficientemente e também para remover alelos deletérios. É relativamente baixo o nível de recombinação documentado, o que sugere que é mais uma ocorrência esporádica a mercê da oportunidade ecológica do que seletivamente determine o traço que aumenta a forma viral (HOLMES & TWIDDY, 2003).

Ainda não se sabe o significado destas afirmações, a diversidade genética dos vírus dengue pode ocasionar o aparecimento de cepas com maior capacidade de replicação, de mais fácil transmissão ou mais virulentas (GUZMÁN et al., 2006).

## 5.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Conforme a árvore filogenética gerada baseada na região C/prM, há forte evidência de que todos os vírus DEN-3 analisados neste estudo pertencem ao genótipo III junto com as cepas indiana, brasileira e um grande número de cepas geograficamente diversas. Todos os vírus DEN-3 isolados no Amazonas estavam muito próximos à cepa indiana GWL-60 (Nº de acesso AY770512) e a cepa brasileira BR-74886 (Nº de acesso AY679147).

O subtipo III está relacionado a surtos de DHF em províncias da Índia, indicando que este vírus é facilmente transmitido aos humanos e mosquitos e pode adaptar-se a novas áreas (DASH et al., 2006). No Brasil, a predominância do vírus DEN-3 dois anos após sua introdução em 2000, foi associado a epidemias mais severas em termos de manifestações clínicas mais graves, e ao número de mortes causado por este sorotipo (NOGUEIRA et al., 2005). Vinte e duas cepas foram classificadas como subtipo III de DEN-3 (MIAGOSTOVICH et al., 2002), a similaridade destas cepas a outras representadas pelo mesmo genótipo III variou de 96% a 98% e de 98 a 99% para as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Estes dados demonstram que este vírus está circulando em todo mundo, indicando novamente seu alto potencial de distribuição, adaptação e domínio em diversas áreas geográficas do mundo, este subtipo tem sido implicado em epidemias de DHF na Ásia, África e Américas, e tem alto potencial para causar uma pandemia de dengue (MESSER et al., 2003).

O estudo do genoma destas cepas talvez possa elucidar algumas questões tais como a baixa freqüência de casos hemorrágicos de dengue em uma cidade com circulação simultânea

agora de quatro sorotipos. O DEN-4 sozinho pode ou não ser capaz de causar casos mais graves?

Isto acontece somente em associação com o DEN-3?

## 6. CONCLUSÕES

1- Utilizando o isolamento viral e técnicas moleculares foi identificado pela primeira vez no Amazonas um caso autóctone de DEN-4; a co-infecção entre DEN-2 / DEN-4 e DEN-3 / DEN-4; a grande incidência de DEN-3 em relação ao DEN-2 e DEN-4, e a ausência do DEN-1, demonstrando a situação epidemiológica do dengue em Manaus.

2- Não foram observadas mudanças em relação à faixa etária mais atingida; a positividade ainda é maior entre adultos de 15-40 anos, e homens e mulheres foram igualmente infectados.

3- Em Manaus os bairros das zonas Centro-Oeste, Sul e Oeste apresentaram maior número de positivos.

4- Manifestações clínicas mais severas foram observadas somente em dois casos com infecção simultânea dos sorotipos DEN-3 e 4. A virulência das amostras deve ser considerada, no entanto é necessário levar em conta os fatores do próprio hospedeiro.

5- Há forte evidência que os vírus DEN-3 analisados pertencem ao genótipo III. Pois as seqüências encontradas no Amazonas estão mais próximas da seqüência asiática e da seqüência brasileira.

6- Os vírus DEN-2, DEN-3 e DEN-4 foram identificados por RT-PCR, em amostras negativas pelo isolamento viral. Isto enfatiza que o RT-PCR deve também ser usado em estudos epidemiológicos, especialmente quando outras metodologias são inconclusivas.

7- Somente pelo seqüenciamento do produto de PCR foi possível concluir os casos de co-infecção, detectar a recombinação entre os sorotipos e identificar os genótipos circulantes.

8- Foi verificada uma forte evidência de recombinação entre os sorotipos DEN-2 e DEN-4 verificada pela reação de seqüenciamento após a clonagem. A caracterização genética desta

amostra em particular e sua associação com a virulência, só poderá ser concluído pela continuação destas pesquisas.

9- Primeira detecção de DEN-4 em Manaus, Amazonas e o primeiro isolamento deste sorotipo no Brasil durante os últimos 25 anos. Este resultado reforça a necessidade de estudos epidemiológicos usando técnicas clássicas e moleculares para o estudo e vigilância de doenças emergentes e re-emergentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2006. 101(8): 925-928.

AYLLÓN, L.L.; MARTINEZ, E.; KOURI, G.; GUZMAN, M.G.; PARADOA, M.L. 1989. Factores del huésped en la fiebre hemorrágica dengue-síndrome de shock por dengue (FHD/SSD) em el niño. *Rev. Cubana Pediatr*, 1989. 61: 498-517.

BASTOS, M.S. Perfil soropidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001). Dissertação de Mestrado, Manaus: Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

BRAVO, J.; GUZMÁN, M.G.; KOURÍ, G. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? I. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987. 81: 816-820.

CASTRO, J.N.C. Aspectos virológicos do dengue no Estado do Amazonas. Dissertação de Mestrado – Universidade do Estado do Amazonas. 2004.63p.

CASTRO, M.G.; NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Dengue vírus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004.99: 809-814.

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Brasília (DF): 1999.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 1990. 44: 649-688.

CHEVILLON, C.; & FAILLOUX, A.B. Questions on viral population biology to complete dengue puzzle. *Trends Microbiol*.2003. 3: 19-28.

CHUNLIN ZHANG et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *Journal of Virology*, 2005. p.15123–15130

COLINA, R.; CASANE, D.; VASQUEZ, S. et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 2004. 85:31-37.

CRAIG S.; THU, H.M.; LOWRY, K.; WANG, X.F.; HOLMES, E.C.; AASOV, J. Diverse dengue type 2 virus populations contain recombinant and both parental viruses in a single mosquito host. *J Virol*, 2003. 77: 4463-4467.

CUNHA, R.V. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Infecção pelos Vírus Dengue em Áreas Endêmicas do Brasil, Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.128 pp.

CUNHA, R.V. & NOGUEIRA, R.M. Dengue e Dengue Hemorrágico. In: *Dinâmica das doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2005. p.1767-1781.

DASH, P.K. et al. Reemergence of dengue vírus type-3 (subtype-III) in Índia: Implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virology Journal*, 2006.

DEGALLIER, N. et al. Avaliação do Risco de Transmissão Silvestre da Dengue no Brasil. Informe Epidemiológico do SUS, 2001. 10 (1): 13-15.

DIAS, M.; ZAGNE, S.M.O.; PACHECO, M.; STAVOLA, M.S.; COSTA, A.J.L. Dengue hemorrágico em Niterói. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1991. 24 (2): 122.

DIVISION OF VECTOR-BORNE INFECTIOUS DISEASES. Dengue 3 in Central America. Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico. Dengue surveillance, 1995. 70: 1-4.

DONALISIO, M.R. de C. O enfrentamento de epidemias: as estratégias e perspectivas do controle do dengue. 1995. Tese - Universidade de Campinas, Campinas.

DOS SANTOS, F.B. Isolamento e caracterização molecular de amostras de vírus dengue circulante no Estado do Rio de Janeiro, 1998. Dissertação de Mestrado- Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. 2000.117p.

FIGUEIREDO, R.M.P.; BASTOS, M.S.; LIMA, M.L.; ALMEIDA, T.C.; ALECRIM, W.D. Dinâmica da sorologia e isolamento viral na epidemia de dengue em Manaus (1998-2001). In: Resumos do XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2002.

FIGUEIREDO, R.M.P.; SILVA, M.N.R.; ALMEIDA, T.C.; LOPES, H.C.; BASTOS, M.S. Diagnóstico virológico de dengue em pacientes com quadro febril não diferenciado. In: Resumos do XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003.

FIGUEIREDO, R.M.P.; THATCHER, B.D.; LIMA, M.L.; ALMEIDA, T.C.; ALECRIM, W.D.; GUERRA, M.V.F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas no período de 1998 -1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2004.37: 476-479.

FONG, M.Y.; KOH, C.L.; LAM, S.K. Molecular epidemiology of Malaysian dengue 2 viruses isolated over twenty-five years (1968-1993). *Res. Virol.* 1998. 149: 457-464.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico (in press). Brasília (DF): 1999.

GUBLER, D.J.; KUNO, G.; SATHER, G. E. & WATERMAN, S.H. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 170-173, 1985.

GUBLER, D.J. Dengue/dengue hemorrhagic fever in the Americas: prospects for the year 2000. In: *Dengue, a worldwide problem, a common strategy. Proceedings of the International Conference on Dengue and Aedes aegypti Community-based Control*. México: Ministry of Health, 1992. p. 19-27.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, 1997. p. 1-22.

GUBLER, D.J. Dengue e dengue haemorrhagic fever. *Rev Clin. Micro.*, 1998. 11, 480-496.

GUZMAN, T.M.G. et al. Aislamiento del virus del dengue 2 en sueros de pacientes utilizando el raton lactante y cultivo de celulas LLCMK2. Ver. *Cubana Med Trop*, 1984. 36 (1): 4-10.

GUZMÁN, M.G., KOURI, G.; BRAVO, J. Is sequential infection a risk factor for DHF/DSS? Arthropod-borne Virus Information Exchange, 1986. June: 172-175.

GUZMÁN, M.G. et al. Relaciones genéticas del virus dengue 3 aislado en la epidemia de FHD en Nicaragua, 1994. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 1996. 48: 114-117.

GUZMÁN, M.G.; ALVAREZ, M.; RODRIGUEZ, R.; et al. Fatal dengue haemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 1999; 3: 130-35.

GUZMÁN, M.G; KOURI, G. & GONZALES, J.R.B. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue em las Americas. Reemergencia del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 1999. 51: 5-13.

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

GUZMÁN, M.G. Sequential dengue infection. The Cuban experience. *Dengue Digest*. 2005. 2(3):2.

GUZMÁN, M.G.; GARCIA, G.; KOURI, G. El dengue y el dengue hemorragico: prioridades de investigacion. *Rev Panam Salud Publica*. 2006. 19(3): 204-215.

HAHN, C.S.; LUSTIG, S.; STRAUSS, E.G. AND STRAUSS, J.H. Western equine encephalitis virus is a recombination virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 85: 5997-6001.

HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S.; YAMARAT, C.; RUSSELL, P.K. Haemorrhagic fever in Thailand: newer knowledge regarding etiology. *J Med Sci Biol*, 1967. 17: 96–103.

HALSTEAD, S.B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever.VI: hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med*, 1970; 42: 350–62.

HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S.N.Observation related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovery. *Yale J Biol Med*. 1970. 42: 311-28.

HALSTEAD, S.B; PAPAVALANGELOU, G. Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1980. p. 635-637.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 1988. 234: 476 -480.

HALSTEAD, S.B. Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian.J Trop Med Public Health*. 1990. 21:636- 641.

HALSTEAD, S.B.; HEINZ F.X.; BARRET, A.D.T.; ROEHRIG, J.T. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine*, 2005. 23: 849-56.

HOLMES, E.C.;BARTLEY, L.M.; GARNET, G.P. The emergence of dengue past, present and future. In: KRAUSE, R. M. *Emerging infectors*, London: Academic Press, 1998. p. 301-25.

HOLMES, E. C.; WOROBEY, M. & RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Molec. Biol. Evol.*, 1999.16: 406-409.

HOLMES,E.C.; TWIDDY, S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 2003. 3: 19-28.

HOLMES, E.C. Evolution of dengue virus In: **New Treatment strategies for dengue and other Flaviviral diseases**. Novartis Foundation. 2006. p.177-187.

HOWE, G.M. A world geography of human diseases. New York: Academic Press, 1977. p.302-317.

IGARASHI, A. Isolation of Singhs *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *Journal of General Virology*, 1978. 40: 531-544.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Cejup: UEPA, 1997.

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURI. Tecnicas de laboratório para el diagnostico y la caracterizacion del vírus dengue. Cidade de Havana: 2001.

JOSHI, V.; SHARMA, R.C.; SHARMA, Y.; ADHA, S.; SHARMA, K.; SINGH, H.; PUROHIT, A.; SINGHI, M. Importance of socioeconomic status and tree holes i distribution of *Aedes* mosquitoes (Diptera:Culicidae) in Jodhpur, Rajasthan, India. *J. Med Entomol*, 2006. 43: 330-336.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. *American Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 1985. p.1141.

KLIKS, S.C.; NIMMANITYA, S.; NISALAK, A.; BURKE, D.S. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue haemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*, 1988. 38: 411–19.

KIMURA, R.; HOTTA, S. On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igakka*, 1994. p.629-633.

KOURÍ, G.P.; GUZMAN, M.G; BRAVO, J. Dengue hemorrágico em Cuba. Crônica de uma epidemia. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 1986.100: 322- 329.

KOURI, G.P.; GUZMAN, M.G.; BRAVO, J.R. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2: an integral analysis. *Trans Soc Trop Med Hyg*, 1987; 81: 821–23.

KOURI, G.P. Advances in the molecular epidemiology studies of dengue viruse.*Archivos Venezolanos de Medicina Tropical*. 1997. 5:2.

KUMAR, S.; K. TAMURA, et al. MEGA 3: integrad software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004. 5: 150-163.

KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D.J. Detecting artificial antidengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1987.36: 153-159.

KUNO, G. Factors influencing the transmission of dengue viruses. Pp. 61-88 in D.J. Gubler and G. Kuno, eds. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, Wallingford, U.K, 1997.

LAI, M.M.C. RNA recombination in animal and plant virases. *Microbiol. Rev.*, 1992. 56: 61-79.

LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*., 1992. 30: 545-551.

LANCIOTTI, R.S.; LEWIS, J.G.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and epidemiology of dengue 3 viruses. *J Gen Virol*, 1994. 75: 65-75.

LANCIOTTI, R.S.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* , 1997. 78: 2279-2286.

LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.M.; SALAS, R.; VILLALOBOS DE CHACON, I.; RAMOS, C.; RICO-HESSSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*, 1999. 73: 4738-4747.

LEWIS, J.G.; CHANG, G.J.; LANCIOTT, R.S.; KINNEY, R.M.; MAYER, L.M.; TRENT, D.W. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*, 1993.197: 216-224.

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), *Virology*, 4<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.p. 991-1041.

LIN, S.R. et al. Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. 2004. *J Virol* 78: 12717-12721.

LORONO, P.M.; FARFAN, A.J.; ROSADO, P.E.; KUNO, G.; GUBLER, D.J. Epidemic of dengue in the Yucatan, Mexico. *Rev Instit Med Trop Sao Paulo*, 1993. 35: 449-455.

MARTINEZ, E.; KOURI, G.; GUZMAN, M.G.; PARADOA, M.; AYLLON, L.L. Race, chronic diseases and HLA antigens in DHF/DSS. *Arthropod-borne Virus Information Exchange*, 1988.p. 157-160.

MARTINEZ-TORRES, M.E. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: 1990. p.180.

McCLOUD, T.G.; CARDIFF, R.D.; BRANDT, W.E.; CHEIWSILP, D. & RUSSEL, P.K. Separation of dengue strains on the basis of a nonstructural antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1971. 20:964-968.

MEIRA, R. "Urucubaca" Gripe ou dengue? Dengue. In: *Clínica Médica. O Estado de São Paulo*, 1946. p. 273 -85.

MESSER, WB, GUBLER, D.J.; HARRIS, E.; SIVANANTHAN K.; DE SILVA AM; Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*, 2003. 9: 800-9.

MEYERS, R.M. & CAREY, D.E. Concurrent isolation from patient of two arboviruses, chikungunya and dengue type 2. *Science*, 1967. 157: 1307-1308.

MIAGOSTOVICH, M.P.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; LANCIOTTI, R.S. Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1998. 93:625 -626.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE; CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. Informe Epidemiológico do SUS. Brasília (DF): 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE; CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. Informe Epidemiológico do SUS. Brasília (DF): 2005

MONATH, TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. 91: 2395-2400.

MONATH, T.P. & HEINZ, F.X. Flaviviruses. In: Virology. Philadelphia Raven Publishers, 1996. p. 961-1034.

MORIER, L.; GUZMAN, M.G.; KOURÍ, G.; SOLER, M.; ALEMÁN, M.R. The lapse between the two infections with dengue virus as a risk factor for DHF/DSS. Arthropod-borne Virus Information Exchange, 1987. p. 130-132.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H.G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2000.16 (1), p. 205.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.M.B.; PEREIRA, M.A.S; SCHATZMAYR, H.G. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001. 96(7): 925-926.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue vírus in Brazil. *Dengue Bull*, 2002. 26: 1-10.

NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMA, Y.R.H.G.; FILIPPIS, A.M.B.; SANTOS, F.V.; CUNHA, R.V.; COELHO, J.O.; SOUZA, L.J.; GUIMARÃES, F.R.; ARAÚJO, E.S.M.; DE SIMONE, T.S.; BARAN, M.; TEIXEIRA, G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*, 2005. 11: 1376-1381.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle. In: *Dengue Hemorrágica*, 2001. p.25-33.

OSANAI, C.H. A epidemia de Dengue em Boa Vista, território Federal de Roraima, 1981 -1982. Dissertação - Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1984.

OCAZIONEZ, R.; CORTÉS, F.; VILLAR, L.A.; GÓMEZ, S.Y. Temporal distribution of dengue vírus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2006.101(7): 725-731.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and Dengue Haemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Washington: 1994.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Country reports to PAHO. Number of reported cases of dengue hemorrhagic fever. 1999.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the América (by country and subregion). Disponível no site: [www.paho.org/english/ad/dpe/cd/dengue-cases-2000htm](http://www.paho.org/english/ad/dpe/cd/dengue-cases-2000htm), em 26/01/2005.

PASSOS, M.N.P.; SANTOS, L.M.J.G.; PEREIRA, M.R.R.; CASALI, C.G.; FORTES, B.P.M.D.; VALENCIA, L.I.O.; ALEXANDRE, A.J.; MEDRONHO, R.A. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004,37:1-9.

PEDRO, A. O dengue em Niterói. Brasil - Médico, 1923. 1:173 -177.

PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Arboviroses. In: *Diagnóstico e tratamento das doenças infectuosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan, 1983. p.291-302.

PINHEIRO, F.P. Los programas de erradicacion y de control del *Aedes aegypti* em las América. OPS/HCP/HCT/96.63, 1996.

PINHEIRO, F.P.; CORBER, S.J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Statist Quart*, 1997. 50: 161–68.

PORTAL AMAZÔNIA – Zona Franca de Manaus – Disponível no site [www.manausonline.com](http://www.manausonline.com).

RAMOS, C.;SANCHEZ,G.; HERNANDEZ-PANDO, R.; BAQUERA, J.; HERNANDEZ, D; MOTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; LLAUSAS, E. Dengue vírus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J NeuroVirology* ,1998. 4: 465-468.

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

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; SALAS, R.A.; TOVAR, D.; NISALAK, A. RAMOS, C.; BOSHELL, J.; de MESA, M.T.; NOGUEIRA, R.M.R.; da ROSA, A.T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Américas. *Virology*, 1997. 230: 244-251.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; NISALAK, A.; VAUGHN, D.W.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998. 58: 96-101.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Vir Res*, 2003. 59: 315-341.

RUSSEL, P.K. & MCCOWN, J.M. Comparison of dengue 2 and dengue 3 virus strains by neutralization tests and identification of a serotype of dengue 3. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1972. 21:97-99.

SANCHEZ, I.J.; RUIZ, B.H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J.Gen. Virol.*, 1996.77: 2541-2545.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1977.74: 5463-5467.

SANTOS, C.L.S.; BASTOS, M.A.A.; SALLUM, M.A.M. & ROCCO, I.M. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 2003.45 (1): 11-16.

SANTOS, F.B.; MIAGOSTOVICH, M.P.; NOGUEIRA, R.M.R.; EDGIL, D.; SCHATZMAYR, H.G.; RILEY, L.W., HARRIS, E. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002. 97: 991-995.

SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, MD. Introdução a virologia humana. Guanabara Koogan, 2002. p.177-178.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Dengue: Boletim da semana 37/2005. Disponível em: <http://dtr2001.saúde.gov.br/svs>.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Dengue: Boletim da semana 42/2006. Disponível em: <http://dtr2001.saúde.gov.br/svs>.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Informe epidemiológico da dengue, janeiro a novembro de 2007. Disponível em: <http://dtr2001.saúde.gov.br/svs>.

SHOPE, R.E. The use of a hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of a forest animals. *In: Anais de Microbiologia (Rio de Janeiro)*, 1963. 11 (Part A):167-171.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, M.L.; MOTA, E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed used on trends, surveillance, and control experiences? *Cadernos de Saúde Pública*, 2005. 21(5): 1307-1315.

TOLOU, H.J.; COUISSINIER-PARIS, P.; DURAND, J.P. et al. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J. Gen. Virol.*, 2001. 82: 1283-1290.

TWIDDY, S.S.; HOLMES, E.C. The extent of homologous recombination in members of the genus flavivirus. *J. Gen Virol.*, 2003. 84: 429-40.

UZCATEGUI, N.; COMACHO, D.; CAMACH, G.; SALCEDO, M.; CUELLO DE UZCATEGUI; HOLMES, E.; GOULD, E.A. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for *in situ* virus evolution and recombination. *J Gen Virology*, 2001. 82: 2945-2953.

UZCATEGUI, N.; COMACH, G.; CAMACHO, D.; SALCEDO, M.; CABELLO DE QUINTANA, M.; JIMENEZ, M.; SIERRA, G.; CUELLO DE UZCATEGUI, R.; JAMES, W.S.; TURNER, S.; HOLMES, E.; GOULD, E. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virology*, 2003. 84: 1569-1575.

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; FREITAS, R.B.; DEGALLIER, N.; RODRIGUES, S. G. & TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Epidemia de febre clássica do dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaína, Tocantins, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1993. 35: 141-148.

VASCONCELOS, P.F.C.; LIMA, J.W.O.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TIMBÓ, M. J.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; LIMA, H.R.; RODRIGUES, S. G. & TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. *Revista de Saúde Publica*, 1998. 32: 447-454.

VASCONCELOS, P.F.C. et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: *An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries*, 1998. p. 73 -99.

VIVERDE TURISMO -Informações científicas da Amazônia. Disponível no site [www.viverde.com.br](http://www.viverde.com.br)

VORNDAM, V.; NOGUEIRA, R.M.R. & TRENT, D.W. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. *Arch Virol*, 1994. 136:191-196.

ZAGNE, S.M.O. et al. Dengue Haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study

of 56 confirmed cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994. 88: 677-679.

ZHANG, C. et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *Journal of virology*, 2005. 79: 15123-15130.

WANG, E.; NI H.; XU R.; BARRET ADT; WAROWICH SJ.; GUBLER DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.*, 2000. 74: 3227-34.

WANG, W.K.; LIN, S.R.; LEE, C.M.; KING, C.C.; CHANG, S.C. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J. Virol.*, 2002. 76: 4662-5.

WATTS, D.M.; PORTER, K.R.; PUTVATANA, P.; et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 1999. 354: 1431–33.

WEAVER, SC.; SCOTT, T.H.; RICO-HESSE, R. Molecular evolution of eastern equine encephalomyelitis virus in North America. *Virology*, 1991. 182(2): 774-84.

WEAVER, S.C.; BARRET, A.D.T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.*, 2004. 2: 789-801.

WENMING, P.; MAN, Y.; BAOCHANG, F.; YONGQIANG, D.; TAO, J.; HONGYUAN, D. Simultaneous infection with dengue 2 and 3 viruses in a Chinese patient return from Sri Lanka. *J Clin Virol*, 2005. 32: 194-198.

WESTAWAY, E.G. et al. Flaviviridae. *Intervirolgy*, 1985. 24: 183-192.

WHO. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2 nd ed., Geneva: WHO, 1997.

WHO. Scientific working group on dengue. Meeting report, Geneva, Switzerland, 3–5 April 2000. Geneva: WHO, 2000.

WOROBAY, M.; RAMBAUT, A. & HOLMES, E.C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 96: 7352-7357, 1999.



## ANEXOS

ANEXO I



**FMT-AM**

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas



GOVERNO DO ESTADO DO  
**AMAZONAS**

Manaus, 28 de Dezembro de 2007.

Ao Investigador Principal  
Regina Maria Pinto de Figueiredo  
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Referente ao estudo intitulado: "Variabilidade genética do vírus dengue, DEN-1 e DEN-2, no Estado do Amazonas, Brasil" .

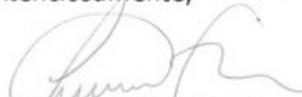
Protocolo Nº: 272/2005 CAAE:0004.0.114.000-05

Prezada Sra. Regina Maria Pinto de Figueiredo,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas tomou conhecimento da solicitação feita por meio do Memo ARBO 32/2007 e aprovou o seguinte protocolo referente ao estudo supracitado:

1. Alteração do título inicial do projeto para: "Caracterização molecular e epidemiológica dos vírus dengue no Estado do Amazonas".

Atenciosamente,

  
Luiz Carlos de Lima Ferreira  
Coordenador de Ética em Pesquisa  
FMT-AM

## ANEXO II

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Coordenador (a): Regina Maria Pinto de Figueiredo M,Sc

Instituição: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Título: Caracterização molecular e epidemiológica dos vírus dengue no Estado do Amazonas.

Patrocinador: CNPq

#### Descrição e objetivo do estudo

Aplicação de técnicas moleculares na identificação dos vírus Dengue circulante no Amazonas, com caracterização imunológica e biomolecular, em adição identificar os genótipos que circulam no Amazonas e sua associação com as formas mais severas da doença, correlacionar os aspectos clínicos e laboratoriais mais importantes dos casos de Dengue, Febre Hemorrágica do Dengue (DHF) e da Síndrome de Choque por Dengue (DSS), com os genótipos existentes em cada sorotipo, estabelecer significância clínica entre os genótipos identificados, Comparar os resultados obtidos através do seqüenciamento de parte dos genes C e prM dos sorotipos de dengue com as seqüências depositadas no GenBank.

Eu recebi a explicação de que eu participarei deste estudo. Minha participação é absolutamente voluntária se eu voluntariamente concordar em participar deste estudo, eu permitirei que uma amostra de sangue da fase aguda coletada (5 ml de sangue das crianças e 10 ml dos adultos) por punção venosa para a realização de um hemograma completo e posteriormente para o isolamento viral, nesta ocasião por punção digital será feito o exame de malária. Após cinco dias, uma amostra da fase convalescente será obtida para teste através da reação de do ensaio imunoenzimático contra o vírus dengue.

Nem diferentes testes laboratoriais serão realizados e nem eu precisarei de hospitalização. Antes da coleta de sangue responderei a um questionário com dados clínicos, demográficos e epidemiológicos.

O preenchimento deste questionário e a primeira coleta serão realizados em apenas uma ocasião, após cinco dias como citado acima será efetuada a segunda coleta.

#### Riscos associados ao estudo

Retirada de amostra de sangue: o seu maior desconforto é no momento em que a pele for ferida por uma agulha.

#### Benefícios

Participando neste estudo, eu estarei contribuindo para o conhecimento das causas de doenças febris e para a implantação do diagnóstico molecular do vírus dengue em Manaus.

#### Confidencialidade e avaliação dos registros

Minha participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados serão mostrados apenas a representantes da FMT, bem como a autoridades normativas nacionais e internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos. Minha identidade permanecerá sempre em confidencialidade. O patrocinador me assegura que isto acontecerá, de acordo com as normas/ leis regulatórias de

proteção nacionais ou internacionais.

**Direito à retirada do estudo**

Eu tenho o direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou conhecidos durante a participação neste estudo.

Eu serei notificado com referência a qualquer nova informação relacionada com o estudo, eu serei capaz de contatar Dra. Regina Maria Pinto de Figueiredo, cujo número de telefone é 2127-3450. Eu tenho direito de retirar minha participação neste estudo a qualquer momento.

**Participação voluntária**

A minha participação neste estudo é voluntária. Se eu (ele/ela) recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que eu tenha direito. Eu tenho direito de manter uma cópia assinada deste documento.

**Consentimento pós- informação**

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Paciente ou Representante Legal

...../...../.....

...../...../.....

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável

\_\_\_\_\_  
Data

ANEXO III

**Solicitação de Sorologia para Doenças Emergentes**

NOME:.....REGISTRO:.....

DATA DE NASCIMENTO:.....IDADE:.....SEXO: M ( ) F ( )

RES:.....FONE:.....

BAIRRO:\_\_\_\_\_MUNICÍPIO\_\_\_\_\_ESTADO:\_\_\_\_\_

BAIRRO ONDE TRABALHA:\_\_\_\_\_

VIAJOU FORA DE MANAUS+/- 15 DIAS ANTES DO INÍCIO DA FEBRE: ( ) LOCALIDADE\_\_\_\_\_

HOUVE CONTATO COM DOENÇA EXANTEMÁTICA? ( ) QUAL (S)/ONDE?\_\_\_\_\_

PROCEDENCIA ( ) 1. AMBULATÓRIO 3. ENFERMARIA 5. UAR  
2. ANATOMIA PATOLÓGICA 4. P.A LEITO: \_\_\_\_\_ 6. OUTROS:\_\_\_\_\_

DATA DE INICIO DOS SINTOMAS \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

- ( ) FEBRE ( ) MIALGIAS ( ) EXANTEMA ( ) SANGRAMENTO ( ) VÔMITO  
( ) CEFALÉIA ( ) ARTRALGIAS ( ) FOTOFobia ( ) RIGIDEZ NA NUCA ( ) LINFONODOS  
( ) DOR GLOBO OCULAR ( ) DOR ÓSSEA ( ) ICTERÍCIA ( ) SINDROME RESPIRATÓRIA

INDICAÇÃO PARA EXAME: ( )

- |                              |                  |                     |
|------------------------------|------------------|---------------------|
| 1. CANDIRÚ                   | 6. FEBRE AMARELA | 11. OROPOUCHE       |
| 2. DENGUE                    | 7. GUAMÁ         | 12. PARVOVIRUS B-19 |
| 3. ENCEFALITE E. VENEZUELANA | 8. HANTAVÍRUS    | 13. RUBEOLA         |
| 4. ENCEALITE E. LESTE        | 9. ILHÉUS        | 14. SARAMPO         |
| 5. ENCEFALITE DE SÃO LUÍS    | 10. MAYARO       | 15. _____           |

OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

NOME E/OU CARIMBO DO REQUISITANTE: \_\_\_\_\_

DATA DA COLETA DA AMOSTRA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ TIPO: \_\_\_\_\_ NÚMERO: \_\_\_\_\_

## ANEXO IV

### Protocolo para o teste de Elisa -IgM- Dengue

Preparação da placa: lavar a placa 5x com PBS pH7.4 e batê-la suavemente até que seque.

Sensibilização: cobrir cada well com 100µl de anti IgM humana diluída em tampão de carbonato pH9.6.

Incubar overnight a 4°C.

Câmara úmida.

Lavar a placa 5x. Secar.

Bloqueio: colocar 150µl de PBS+BSA 4% em cada well.

Incubar 30 min. em temperatura ambiente (TA).

Câmara úmida.

Lavar a placa 5x. Secar.

Soros e controles: distribuir 50µl dos soros a testar e controles na diluição de 1:40 em PBS+BSA 0,5%.

Incubar 1 hora a 37°C em câmara úmida.

Lavar a placa 5x. Secar.

Antígeno: colocar 50µl do antígeno dengue ( pool de antígeno DEN-1+DEN-2+DEN-3) diluído em PBS+SHN 20%.

Incubar overnight a 4°C. D1 = 1 / 10 F.A= 1/30

Câmara úmida. D2 = 1 / 20

Lavar a placa 5x. Secar. D3 = 1/ 25

Conjugado: colocar 25µl de HRP conjugated 6B6C-1 monoclonal antibody/Jackson imuno research diluído em PBS+SHN 20%.

Incubar 1 hora a 37°C. 1/6000

Câmara úmida.

Lavar a placa 7x. Secar.

Substrato: colocar 100µl de substrato ABTS(solução A+solução B a 50%).

Incubar 1 hora a 37°C.

Leitura: ler a placa em espectrofotômetro (multiskan) com filtro 405nm.

Obs. A anti-IgM humana, o antígeno e o conjugado são previamente titulados para determinar diluição ótima a ser utilizada no teste.

## ANEXO V

### **Protocolo de Extração com QIAamp Viral RNA Mini Spin Protocolo**

1. Pipetar 560 µl do Buffer AVL contendo Carrier RNA em um tubo de 1.5 ml.
2. Adicionar 140µl de plasma, **soro**, urina, sobrenadante de cultura de células, ou fluido do corpo livre de células em um tubo com Buffer AVL/Carrier RNA. Misturar por 15 segundos (pode usar o vortex).
3. Incubar a temperatura ambiente (15 – 25 °C) por 10 minutos.
4. Centrifugar rapidamente para remover gotículas do lado da tampa.
5. Adicionar 560µl de etanol 100% (gelado) na amostra, misturar vortexando por 15 segundos. Após misturar centrifugar rapidamente para remover gotículas do lado interno da tampa.
6. Cuidadosamente aplicar 630 µl da solução do passo 5 na coluna QIAamp ( em um tubo de 2ml). Centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Coloque a coluna em tubo de coleta limpo, e descarte o tubo contendo o filtrado.
7. Cuidadosamente abra a coluna, e repita o passo 6.
8. Cuidadosamente abra a coluna, e adicione 500 µl do Buffer AW1. Centrifugue por 8000 rpm por 1 minuto. Coloque a coluna em tubo de 2ml (provido), e descarte o tubo contendo o filtrado.
9. Cuidadosamente abra a coluna e adicione 500 µl do Buffer AW2. Centrifugue a toda velocidade (14000 rpm), por 3 minutos. Continue diretamente no passo 10, ou para eliminar qualquer chance de haver Buffer AW2, execute o passo 9a, e então continue no passo 10.
- 9a (Opcional): Coloque a coluna em um tubo de 2 ml ( NÃO PROVIDO) e descarte o tubo contendo o filtrado. Centrifugue a toda velocidade por 1 minuto.
10. Coloque a coluna em um tubo de 1.5 ml (identifique como RNA e o número da amostra). Descarte o tubo contendo o filtrado. Cuidadosamente abra a coluna e adicione 60 µl do Buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. Incubar por um minuto em temperatura ambiente. Centrifugue a 8000 rpm por 1 minuto.



Cont.

```
[
1222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 ]
[
9000000111 1111222333 3333444444 5555556666 6777778888 8888899999 0000001111 1112223333 3334445555 6667778888 8899999999 ]
[
8134567013 5679259023 56890123 0345672567 8012479123 4578901457 0367890125 6783470356 9256814573 6902589147 8901345679 ]
#D00503Denguetype1_{Dengue1} ACTCGTGTGCAAC CCGCGCTGCA CACACAGGAG GACACACATAG CAGCGAGGGA-ATGTC TGCCCTGTCTT GTCTGCTCTT GOTTGAGTAG CAAGCCAAACC CGGACCTGG
#Dengue2pr_DQ364518_{Dengue2} .T.A.TAA...GA...TA...A.CAAT...A.CACAC.G.TG...AAG GGAAGT.C.CAAGAG.AT...T.TC.G.CACCTTA.GA.T.CG...GTT TCC.AGACA
#Dengue2pr_{Dengue2} .T.A.TAA...TGA...T...A.CAAC...A.CACATC...TGAAAG GGAAGT.C.C.AAAG.ATC.ACG.TCG.C.CCTT.GA...GCT.TT.TTTC.AAGG.
#DENGUE3AY679147BR_{Dengue3} .A.A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#714Dengue_D3_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...TGA.G.A.T...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#D_711_{Dengue3} .A.A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#D_719_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.A.C.A
#D_720_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.A.C.A
#D_175_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#D_722_{Dengue3} .A.A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCACGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#D_728_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT.A...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#735Dengue_D3_{Dengue3} .A.TAG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.A.C.A
#D_738_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#739Dengue_D3_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...T.AC.TA.C.A
#D_751_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#D_1801_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#D_1197_{Dengue3} .A.A.T.AG..A.TT.CTTT...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#1060Dengue_D3_{Dengue3} .A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#D_1132_{Dengue3} .A.A.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...T.AC.TA.C.A
#1101_{Dengue3} .A.R.T.AG..A.TT.CT...TTA...AT...CGCATGG.G.AT...-CACT..AG.CT.TA A...A.A.C.C...AGT.GGCT...AC.TA.C.A
#CloneRNG_D3_A12_{Dengue3} .A.T.???? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#Clone750_3D_B05_{Dengue3} .A.T.???? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#182D3_D1_{Dengue3} ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#660A_D1_{Dengue3} .A.T.???? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#721D3_D1_{Dengue3} ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#736D3_D1_{Dengue3} .A.T.??? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#737Dengue_D3_{Dengue3} .A.T.???? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#938Dengue_D3_{Dengue3} .A.T.???? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#D_756_{Dengue3} .A.T.???? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#D_981_{Dengue3} .A.T.???? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#1402D3_{Dengue3} ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ????????? ?????????
#D_1624_{Dengue3} .A.A.T.C...AA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#AY947539_DENGUE4_{Dengue4} G...A.T.C...AA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#D256_D1_{Dengue4} G...A.T.C...AA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#CloneD239_A09_{Dengue4} G...A.T.C...TAA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#CloneD295_B10_{Dengue4} G...A.T.C...TAA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#Clone1619a_D07_{Dengue4} G...A.T.C...TAA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#Clone750_4D_A06_{Dengue4} G...A.T.C...TAA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#CloneRNG_D4_C04_{Dengue4} G...A.T.C...TAA..TCT.T.A.AA..ATC.ACCTTA.GGC.AAA.G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT
#CloneChimeraRNG_D4_{Chimera} .T.C.A.TA...GA...TA...A.CAAT...AACACAC.G.TG...GA..G.GGGACCTC...AA.A.AGA.A.AA..T.C.CC.TAAG..CGCGTG..T.TACG.TCAT

```

Cont.

```
[
44444444
00001111
01261571
#D00503Denguetype1_{Dengue1} GCGATGT
#Dengue2pr_DQ364518_{Dengue2} AAT.AAA
#Dengue2pr_{Dengue2} AAC.AAA
#DENGUE3AY679147BR_{Dengue3} .T.TAA.
#714Dengue_D3_{Dengue3} .T.TAA.
#D_711_{Dengue3} .T.TAA.
#D_719_{Dengue3} .T.TAA.
#D_720_{Dengue3} .T.TAA.
#D_175_{Dengue3} .T.TAA.
#D_722_{Dengue3} .T.TAA.
#D_728_{Dengue3} .T.TAA.
#735Dengue_D3_{Dengue3} .T.TAA.
#D_738_{Dengue3} .T.TAA.
#739Dengue_D3_{Dengue3} .T.TAA.
#D_751_{Dengue3} .T.TAA.
#D_1801_{Dengue3} .T.TAA.
#D_1197_{Dengue3} .T.TAA.
#1060Dengue_D3_{Dengue3} CT.TAA.
#D_1132_{Dengue3} .T.TAA.
#1101_{Dengue3} .T.TAA.
#CloneRNG_D3_A12_{Dengue3} ????????
#Clone750_3D_B05_{Dengue3} ????????
#182D3_D1_{Dengue3} ????????
#660A_D1_{Dengue3} ????????
#721D3_D1_{Dengue3} ????????
#736D3_D1_{Dengue3} ????????
#737Dengue_D3_{Dengue3} ????????
#938Dengue_D3_{Dengue3} ????????
#D_756_{Dengue3} ????????
#D_981_{Dengue3} ????????
#1402D3_{Dengue3} ????????
#D_1624_{Dengue3} ????????
#AY947539_DENGUE4_{Dengue4} A.CTGA.
#D256_D1_{Dengue4} A.CTAA.
#CloneD239_A09_{Dengue4} ????????
#CloneD295_B10_{Dengue4} ????????
#Clone1619a_D07_{Dengue4} ????????
#Clone750_4D_A06_{Dengue4} ????????
#CloneRNG_D4_C04_{Dengue4} ????????
#CloneChimeraRNG_D4_{Chimera} ????????

```

## ANEXO VII

25-Dec-2007

Dear Prof. Figueiredo:

We are pleased to inform you that your article "Importation of Dengue Type 4 Virus into Manaus, Amazonas, Brazil" has been accepted for publication in Emerging Infectious Diseases. The article will undergo substantive editing for length, grammatical correctness and journal style. The galleys will be sent to you for approval.

Thank you for sending us your article. We look forward to working with you in the months to come.

Dr. D. Peter Drotman  
Editor-in-Chief  
Emerging Infectious Diseases  
[eidchief@cdc.gov](mailto:eidchief@cdc.gov)  
404-639-1960 (phone)  
404-639-1954 (fax)

<http://mc.manuscriptcentral.com/eid>









































This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.